

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Física y Rehabilitación



TESIS DOCTORAL

**Evaluación de la vitamina D sobre la activación de la neurogénesis y
gliogénesis adulta en un modelo de desmielinización aguda**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jesús Adriel Cuevas Morales

Directores

**Jorge Matías-Guiu Guía
Ulises Alfonso Gómez Pinedo
Concepción Cuenca González**

Madrid, 2018

Proyecto de Tesis

Doctorado en Investigación Ciencias Biomédicas

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina Física y Rehabilitación



Evaluación de la vitamina D sobre la activación de la neurogénesis y gliogénesis adulta en un modelo de desmielinización aguda

Doctorando:

Jesús Adriel Cuevas Morales

Directores:

Prof. Jorge Matías-Guiu Guía

Dr. Ulises Alfonso Gómez Pinedo

Dra. Concepción Cuenca González

Madrid 2017

ÍNDICE GENERAL	II
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	V
ABREVIATURAS	VII
RESUMEN	IX

I INTRODUCCIÓN

CAPITULO 1

1. NEUROESTEROIDES	1
1.1 DEFINICIÓN Y BIOSÍNTESIS	1
1.2 BIOLOGÍA DE LOS NEUROESTEROIDES	3
1.3 SÍNTESIS DE NEUROESTEROIDES DE FORMA PERIFÉRICA	6
1.4 NEUROESTEROIDES EN GLIOSIS REACTIVA	7
1.5 VITAMINA D	9
1.5.1 LA VITAMINA D Y EL SISTEMA NERVIOSO	10
1.5.2 TRANSPORTE PLASMÁTICO DE LA VITAMINA D Y TRANSFORMACIÓN A METABOLITOS ACTIVOS	11
1.5.3 INTERNALIZACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LA VITAMINA D	14
1.5.3.1 EL RECEPTOR DE VITAMINA D	16
1.6 METABOLISMO DE LA VITAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	18

CAPITULO 2

2. NEUROGENESIS ADULTA	23
2.1 ORIGEN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA	23
2.2 NEUROGÉNESIS Y GLIOGENESIS ADULTA	24
2.3 NICHOS CLÁSICOS DE PROLIFERACIÓN EN EL CEREBRO ADULTO	25
2.3.1 ZONA SUBVENTRICULAR	26
2.3.1.1 OLIGODENDROGÉNESIS EN LA SVZ	30
2.3.2 HIPOCAMPO	33
2.3.2.1. ANIZACIÓN DE LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA	33
2.3.2.2. TIPOS CELULARES	35

2.4	PROLIFERACIÓN	40
2.5	MIGRACIÓN NEURONAL.	43
2.6	REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO	44
2.6.1	REGULACIÓN POR MUERTE CELULAR	47
CAPITULO 3		
3.	ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES	49
3.1	ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES EN EL SNC	49
3.2	MODELOS EXPERIMENTALES EN ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES	52
3.2.1	MODELOS <i>IN VITRO</i>	54
3.2.2	MODELOS <i>IN VIVO</i>	56
3.2.2.1	MODELOS DE DESMIELINIZACIÓN POR LESIÓN QUÍMICA	58
3.2.2.1.1	LISOLECITINA	58
II JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA		60
III HIPÓTESIS Y OBJETIVOS		62
IV MATERIALES Y MÉTODOS		63
4.1.	ANIMALES	63
4.2.	GRUPOS EXPERIMENTALES	64
4.3.	CIRUGÍA PARA INDUCCIÓN DE LESIÓN DESMIELINIZANTE POR LISOLECITINA	65
4.4.	VARIABLES CLÍNICAS EXPLORADAS	68
4.5.	SACRIFICIO DEL ANIMAL	70
4.6.	PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO	72
4.6.1	TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA	72
4.6.2	ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA	75
4.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	78
V RESULTADOS		79
5.1	VARIABLES CLÍNICAS EXPLORADAS	79
5.2	ZONA SUBVENTRICULAR	82

5.2.1	PROLIFERACIÓN EN LA SVZ	82
5.2.2	DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LA SVZ	84
5.3	ZONA DE LESIÓN	85
5.3.1	PROLIFERACIÓN EN ZONA DE LESIÓN	86
5.3.2	DIFERENCIACIÓN CELULAR EN ZONA DE LESIÓN	88
5.4	RESPUESTA MICROGLIAL	90
5.5	EFFECTOS NEUROPROTECTORES DE LA VITAMINA D	92
5.6	EXPRESIÓN DE MEGALINA EN LAS CELULAS DE LA ZONA DE LESIÓN	93
VI	DISCUSIÓN	95
6.1	PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN EN LA SVZ Y ZONA DE LESIÓN	96
6.2	MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROGLIAL	98
6.3	SUPERVIVENCIA NEURONAL	101
6.4	RECEPTOR DE MEGALINA	103
VII	CONCLUSIONES	107
VIII	BIBLIOGRAFÍA	108

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	Biosíntesis de los neuroesteroides	2
FIGURA 2	Efectos genómicos y no genómicos (neuroactivos).	5
FIGURA 3	Neurogénesis adulta en la SVZ	29
FIGURA 4	Oligodendrogénesis adulta en la SVZ.	32
FIGURA 5	Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl.	35
FIGURA 6	Neurogénesis adulta en la SGZ.	39
FIGURA 7	Animal en marco Estereotáxico	65
FIGURA 8	Representación esquemática de bregma	66
FIGURA 9	Representación esquemática del sitio de inyección	66
FIGURA 10	Imagen del plano Inclinado	69
FIGURA 11	Perfusión intracardiaca	70
FIGURA 12	Esquema de activación microglial	76
FIGURA 13	Peso Corporal	80
FIGURA 14	Plano Inclinado	80
FIGURA 15	Fotomicrografías de la lesión desmielinizante	81
FIGURA 16	Proliferación en SVZ	83
FIGURA 17	Diferenciación en SVZ	85
FIGURA 18	Proliferación en la zona de lesión	87
FIGURA 19	Diferenciación en la zona de lesión	89
FIGURA 20	Respuesta Microglial	91
FIGURA 21	Apoptosis Neuronal	92
FIGURA 22	Expresión de Megalina en las células proliferantes	94

Índice de Tablas

TABLA 1	Clasificación de las enfermedades desmielinizantes	50
TABLA 2	Anticuerpos utilizados	74

ABREVIATURAS

1,25-D:	1,25-dihidroxivitamina D
5-HT:	Serotonina.
8-OHdGua:	8-hidroxideoxiguanosina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
APP:	Proteína precursora de amiloide
ARN:	Ácido ribonucleico
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BrdU:	5'-bromo-2-deoxiuridina.
CNPasa:	nucleótido cíclico fosfodiesterasa
CNTF	factor neurotrófico ciliar
CRH:	Hormona liberadora de la corticotropina
CYP24A	1,25-dihydroxyvitamin D ₃ 24-hydroxylase
DA:	Dopamina.
DBP:	Proteína de unión de la VD
DCX:	Doblecortina
DG:	Giro dentado
DHA:	Dehidroepiandrosterona
DRG:	Neuronas ganglionares de la raíz dorsal
EAE:	Encefalitis alérgica experimental
EB:	Bromuro de etidio
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico.
EM:	Esclerosis Múltiple
EM-PP:	Esclerosis Múltiple Primaria-Progresiva
EM-PR:	Esclerosis Múltiple Progresiva-Recurrente
EM-RR:	Esclerosis Múltiple Recurrente-Remitente
EM-SP	Esclerosis Múltiple Secundaria Progresiva
FGF-2:	Factor de crecimiento de fibroblastos – 2.
GABA:	Ácido γ-aminobutírico.
GCL:	Capa granular del hipocampo.
GNDF:	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP:	Proteína ácida fibrilar glial
IBA1:	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IGF-1:	Factor de crecimiento insulina-1.
LCR:	Líquido cefalorraquídeo
LPC:	Lisolecitina
LRP2:	Low density lipoprotein-related protein 2 o Megalina
MBP:	Proteína básica de mielina
MHC:	Complejo mayor de histocompatibilidad
Mol,Mol L, ML:	Capa molecular.
TNF:	Factor de necrosis tumoral
NAcc:	Núcleo accumbens.
NGF:	Factor de crecimiento nervioso
NMDA:	N-metil-D-aspartato.
NO:	Óxido nítrico.
NOS:	Óxido nítrico sintetasa.
NT-3:	Neurotrofina 3
NT:	Neurotransmisor.
OL	Oligodendrocitos
OPCs:	Células progenitoras de oligodendrocitos
PCNA:	Antígeno nuclear de células proliferativas.
PFA:	Paraformaldehído.
PREG:	Pregnenolona
PROG:	Progesterona
PSA-NCAM:	Polysialated Neural Cell Adhesion Molecule
RMS:	Camino migratorio rostral.
ROS:	Especies reactivas de oxígeno.

RT-PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RXR:	Receptor retinoide X
SGZ:	Capa subgranular del giro dentado del hipocampo.
SN:	Sistema nervioso
SNC:	Sistema nervioso central.
SNP:	Sistema nervioso periférico
SOD:	Superóxido dismutasa.
SVZ:	Zona subventricular de los ventrículos laterales.
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling
VD:	Vitamina D
VDR:	Receptor de la vitamina D
VDRE:	Elementos de respuesta a la VD
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular.

RESUMEN

Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central SNC constituyen un amplio espectro de enfermedades inflamatorias idiopáticas en las que intervienen diferentes procesos y factores que se caracterizan por provocar un daño en la mielina del SNC. La enfermedad más representativa de este grupo es la Esclerosis múltiple (EM). Hay evidencia de que al inicio de la EM, existe una remielinización en las lesiones desmielinizadas. Se sabe poco sobre el papel de la VD durante la mielinización, pero hay varios estudios han indicado un potencial papel de la VD en la mielinización y la remielinización. Además, es considerada como un neuroesteroide. La VD tiene función directa sobre la expresión de la sintasa del ácido nítrico inducible en la microglía, esto podría influir en el equilibrio inflamatorio-antiinflamatorio que es relevante en la remielinización. La VD también aumenta la activación microglial lo que podría facilitar la eliminación de los restos de mielina y facilitar la remielinización. Asimismo, las células madre de origen neural (NSC) expresan VDR y $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ incrementa la proliferación de las NSC y su diferenciación a neuronas y oligodendrocitos reduciendo la astrogliosis. Por lo que la VD es considerada como un neuroesteroide y modula la inflamación y juega un papel primordial en los eventos remielinizantes y neuroprotectores en el sistema nervioso central y puede estimular la generación de oligodendrocitos en los nichos neurogénicos clásicos.

OBJETIVOS: Los objetivos del presente trabajo son, evaluar si la administración de VD modula la inflamación y la gliosis reactiva en un modelo de lesión desmielinizante por lisolecitina, y evaluar si la VD favorece la

remielinización y la generación de OPC y la relación de la megalina en este evento.

MATERIAL Y METODO: 24 ratas Wistar macho adultas fueron utilizadas para el presente estudio, 8 recibieron VD (colecaciferón) durante 30 días (500UI/kg/día) en un periodo de 15 días antes de la inducción del modelo de desmielinización y 15 días más después de la inducción, otras 8 fueron consideradas sham y las 8 restantes solo liolecitina. Todos los animales fueron evaluados clínicamente y sacrificados 30 días después a la lesión, previa administración de BrdU (60mg/kg de peso). Se realizaron técnicas de inmunohistoquímica para analizar la proliferación celular, generación de neuroblastos, OPCs, gliosis reactiva (GFAP/micloglía), mielinización y muerte celular.

RESULTADOS: El tratamiento con VD fue bien tolerado y no se mostró ninguna alteración atribuible a sobredosis o intoxicación tales como: hemorragias, esteatorrea o alteraciones pondentales. Al verificar mediante técnicas de inmunohistoquímica, si la lesión se encontraba generada en las coordenadas establecidas, encontramos que en todos los animales existió lesión en la zona esperada, además de una marcada disminución de la expresión la proteína básica de la mielina, dato analizado y cuantificado en densidades ópticas siendo este dato estadísticamente significativo. En el análisis de la diferenciación celular de la SVZ no existieron diferencias significativas en la cuantificación de la expresión de células GFAP+ que colocalizaban con BrdU, solo el grupo SHAM mostro un ligero incremento en la población astrocitaria. Al analizar la coexpresión de BrdU y GFAP resulto evidente un ligero incremento en el grupo de animales que se les administró

VD, al igual que en la expresión de células DCX/BrdU positivas. Al evaluar la muerte celular, mediante la utilización de caspasa 3, observamos una menor muerte celular en el grupo donde fue administrada la VD, pudiendo atribuir un efecto neuroprotector. En el análisis de células inmaduras de oligodendrocitos en la vecindad de la lesión encontramos de nueva cuenta un incremento de este tipo celular que inclusive era el doble que lo encontrado en los otros dos grupos de trabajo siendo este dato estadístico. Esta última observación es importante ya que muestra que la VD, bajo las condiciones de este estudio, incrementa la proliferación a estirpe oligodendroglial. Por último, el grupo donde se administro VD, mostro una mayor recuperación de la lesión al cuantificar la expresión de MBP.

CONCLUSIONES: La VD tiene efectos sobre la proliferación celular en la SVZ y el cuerpo calloso. La VD favorece la diferenciación celular a células DCX positivas y Olig2 positivas. La VD modula la respuesta microglial favoreciendo un entorno amigable para la regeneración. La VD es neuroprotectora al reducir el número de neuronas caspasa positivas en la vecindad de la lesión.

ABSTRACT

Demyelinating diseases of the central nervous system CNS constitute a broad spectrum of idiopathic inflammatory diseases involving different processes and factors that are characterized by damage to the myelin sheaths of the CNS.

The most representative of this group is the Multiple Sclerosis (MS). There is evidence that at the beginning of the EM, there is a remyelination in the unmyelinated. Little is known about the role of the VD during myelination, but there are several studies have indicated a potential role of the VD in myelination and remyelination. In addition, it is considered as a Neuroesteroid. The VD has direct role on the expression of the inducible nitric acid synthase in the microglia, this could influence the balance inflammatory-anti-inflammatory that is relevant in the remyelination. The VD also increases the microglial activation, which could facilitate the elimination of the remnants of myelin and facilitate remyelination. In addition, the neural stem cells (NSC) express VDR and $1.25(\text{OH})_2\text{D}$. $1.25(\text{OH})_2\text{D}$ increases the proliferation of NSC and their differentiation into neurons and oligodendrocytes by reducing the astrogliosis. So the VD is considered as a neurosteroid and modulates the inflammation and plays an important role in the neuroprotective agents in the central nervous system and can stimulate the generation of oligodendrocytes in the classic neurogenic niches.

OBJECTIVES: The objectives of this study are, assess whether the administration of VD modulates inflammation and reactive gliosis in a model of demyelinating injury by Lysolecithin, and evaluate whether the VD promotes

remyelination and the generation of OPC and the relationship of the megalin in this event.

METHODS AND MATERIALS: 24 adult male Wistar rats were used for the present study, 8 received VD (colecaciferon) during 30 days (500IU/kg/day) in a period of 15 days before the induction of the model of demyelination and 15 days after induction, other 8 were considered sham and the remaining 8 only lysolecithin. All the animals were evaluated clinically and sacrificed 30 days after the injury, previous administration of BrdU (60mg/kg body weight). Immunohistochemical techniques were carried out to analyze the cell proliferation, generation of neuroblasts, oligodendrocytes, Reactive Gliosis (GFAP/microglia), Myelination and cell death.

RESULTS: Treatment with VD was well tolerated and showed no alteration is not attributable to overdose or poisoning, such as: Bleeding, steatorrhea or ponderal alterations. To check using immunohistochemical techniques, if the injury was generated in the coordinates established, we find that in all animals was expected in the area injury, in addition to a marked decrease in the expression of the myelin basic protein, data analyzed and quantified in the optical densities being this data statistically significant. The analysis of the cellular differentiation of the SVZ did not show significant differences in the quantification of the expression of GFAP that co located with BrdU, only the group SHAM showed a slight increase in the astrocytary population. To analyze the coexpression of BrdU and GFAP was evident a slight increase in the group of animals that were given VD, as in the expression of the DCX/BrdU-positive cells. To evaluate cell death, through the use of caspase 3, we observe a cell death in the group that was administered the VD, and may confer a

neuroprotective effect. In the analysis of immature cells of oligodendrocytes in the vicinity of the lesion we find new account an increase of this cell type that even was double that found in the other two groups of work being this statistic. This last point is important because it shows that VD, under the conditions of this study, increases the proliferation to oligodendroglial lineage. Finally, the group where the shot was given you, showed a higher recovery of the injury to quantify the expression of MBP.

CONCLUSIONS: VD has effects on cellular proliferation in the SVZ and the corpus callosum. VD promotes the differentiation of cells DCX positive and Olig2 positive. VD modulates the microglial response by promoting a friendly environment for regeneration. VD is neuroprotective by reducing the number of caspase-positive neurons in the vicinity of the injury.

I.

INTRODUCCION

1. NEUROESTEROIDES

1.1 DEFINICIÓN Y BIOSÍNTESIS

Se denomina “neuroesteroide” a una clase particular de esteroides, que solamente se sintetiza en el sistema nervioso central “*de novo*” (Baulieu, 1996, 2000); son esteroides sintetizados por células gliales del cerebro y en los nervios periféricos, independientemente de la actividad glandular/gonadal periférica (Baulieu 1997). La progesterona, una de las principales hormonas producidas y secretada por ovarios y glándulas adrenales, es considerada como un neuroesteroide, si la síntesis se realiza “*de novo*” en el cerebro ó nervios periféricos (Baulieu, 1997).

En estudios experimentales realizados en el cerebro de roedores, se observó que los astrocitos y oligodendrocitos sintetizan y metabolizan neuroesteroides (Baulieu, 1990; Robel et al., 1995a), lo mismo sucedió con las células de Schwann del sistema nervioso periférico (SNP) –sintetizan progesterona (PROG) a partir de pregnenolona (PREG), independientemente del sexo y de la edad (Jung-Testas et al., 1996; Koenig et al., 1995;2000; Baulieu, 2000). En cambio, hasta el momento no se ha demostrado la síntesis de pregnenolona en neuronas (Baulieu et al., 1997).

Las rutas metabólicas de la esteroidogénesis comienzan con la conversión de colesterol a PREG, mediada por la enzima citocromo P450scc en la

membrana interna mitocondrial de astrocitos y oligodendrocitos, evento enzimático característico de las células esteroideogénicas en glándulas endocrinas, incluyendo - testículos, ovarios y glándulas adrenales. La PREG es el principal precursor de la síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol en células glandulares esteroideogénicas y “*de novo*” en el tejido nervioso (Baulieu, 1996,1997; Engel, 2001), a partir de ella se origina la PROG y dehidroepiandrosterona (DHA); y luego hasta completar la serie de esteroides (Robel et al., 1995a Baulieu, 1997; Friess, 2000) (Fig.1).

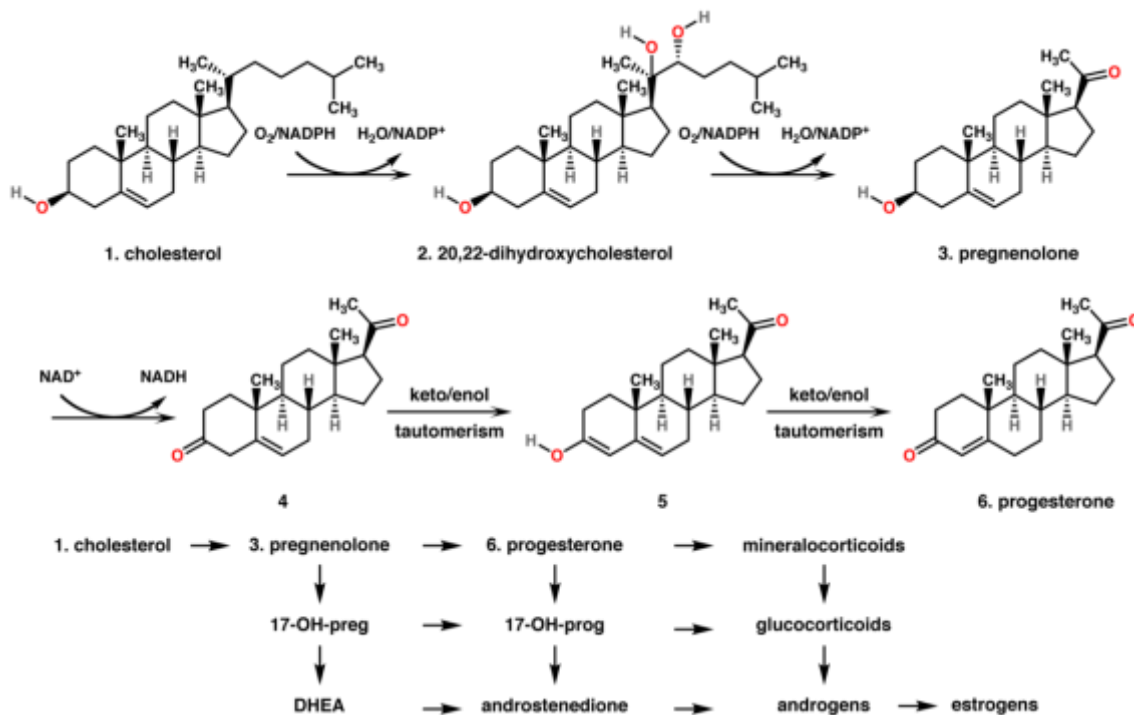


Figura 1. Conversión de colesterol (1) en pregnenolona (3) a progesterona (6). La progesterona es importante para la síntesis de aldosterona (mineralocorticoide), como la 17-Hidroxiprogesterona es para el cortisol (glucocorticoide), y la androstenediona para los esteroides sexuales. (imagen tomada de Keisuke Shibuya 2002)

1.2 BIOLOGÍA DE LOS NEUROESTEROIDES

La PREG, PROG y sus metabolitos reducidos, son los únicos esteroides que pueden ser producidos *de novo* a partir de colesterol en el tejido cerebral (Baulieu et al, 2000), se desconoce el estímulo fisiológico que regula su síntesis, es probable que actúen a través de segundos mensajeros o factores tróficos, como sucede en órganos esteroideogénicos clásicos que al estimular la biosíntesis de esteroides (Baulieu, 1995); también se desconocen los mecanismos de acción neuroreparativos y poco se conoce acerca del metabolismo de regulación, sin embargo; se conoce que son esenciales para las funciones del sistema nervioso (Baulieu, 1990, 2000; Schumacher, 1999). Posiblemente, la síntesis local permita mantener niveles más estables, ejerciendo a la vez una función protectora en el tejido cerebral. Los reducidos niveles circulantes de PREG y PROG durante las etapas del ciclo estral, vejez y los encontrados en el SN de machos, pueden explicar la dependencia de una síntesis local (Baulieu et al., 1997).

Los neuroesteroides, tienen efectos específicos moduladores sobre receptores inotrópicos: inhiben al receptor nicotínico neuronal de acetilcolina (Baulieu, 1995, 2000; Zorumski, 2000), activan los receptores hipotalámicos de oxitocina (Robel et al., 1995b), mientras que, el metabolito reducido $5\alpha,3\alpha$, activa la $3\alpha,5\alpha$ TH-progesterona y éste último, los canales de cloro del complejo receptor GABA_A (Baulieu et al., 1996,1997, 2000; Engel, 2001) (Fig. 2) además

activa glicina y glutamato y por lo tanto; modulan la excitabilidad neuronal (Robel y col., 1995b, del Cerro y col., 1995; Baulieu y col., 1997; Engel, 2001).

Por otra parte, los neuroesteroides ejercen distintos efectos neurotróficos, particularmente durante el desarrollo temprano y en la vida adulta. In vitro, regulan el crecimiento y diferenciación de astroglia (Jung-Testas y et al, 1994; del Cerro et al., 1995; Brinton et al., 2013). Mediante mecanismos autocrinos-paracrinos modulan la respuesta reparativa, al ejercer efectos tróficos en neuronas y células gliales, mediante la inhibición de la cicatriz glial y la supervivencia de neuronas (del Cerro et al., 1995; García-Estrada et al., 1998; Baulieu, 1997, 2000).

Cuando se adicionan a medios de cultivos, los neuroesteroides favorecen la supervivencia neuronal (Baulieu, 1997) y elevan la síntesis de proteínas específica de la mielina; como la proteína básica de mielina (MBP) y el nucleótido cíclico fosfodiesterasa (CNPasa) (Jung-Testas et al, 1994; Desernaud, 1998, Baulieu, 2000). En el SNP de roedores machos, la PROG estimula la regeneración nerviosa al acelerar la maduración de axones regenerados e incrementar la formación de vainas de mielina (Koening et al, 1995, 2000; Bielecki et al, 2016; Matias-Guiu et al., 2016). En términos generales, puede decirse que los neuroesteroides actúan mediante mecanismos de acción genómicos y no-genómicos y a través de una regulación autocrina - paracrina entre neuronas y células gliales (Fig. 2) (Robel y Baulieu 1995, Baulieu et al 1997, 2000; Schumacher, 1999; Colciago et al, 2016).

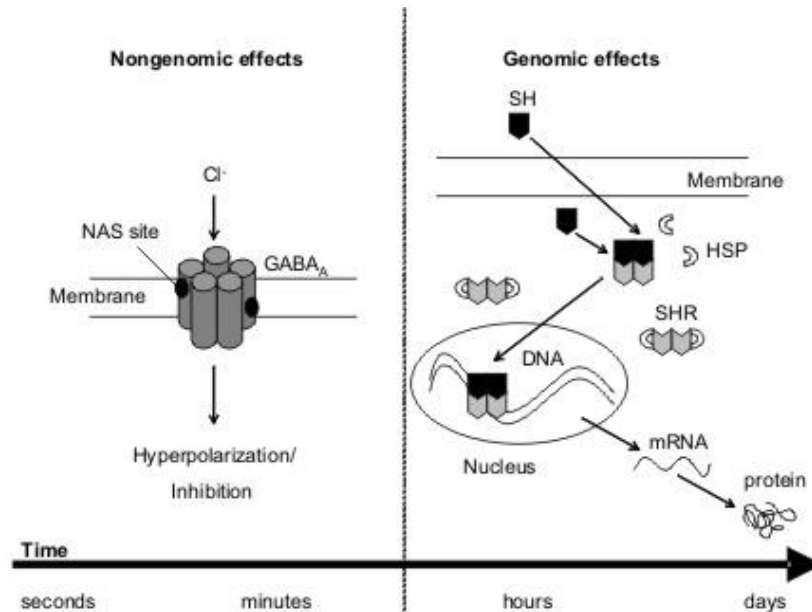


Figura 2. Efectos genómicos y no genómicos (neuroactivos). Los neuroesteroides alteran la excitabilidad neuronal en la membrana celular por la interacción con los receptores de la superficie celular, en este caso, un receptor GABA_A. Las hormonas esteroides se difunden a través de la membrana celular, se unen a los receptores intracelulares, entran en el núcleo y controlan la transcripción de genes y, a su vez, la síntesis de proteínas. Los neuroesteroides ejercen sus efectos en cuestión de segundos a minutos, mientras que los efectos de las hormonas esteroides están limitados por la tasa de síntesis de proteínas y no son evidentes durante horas o días. (imagen tomada de Yanina Shulman 2005)

1.3 SÍNTESIS DE NEUROESTEROIDES DE FORMA PERIFÉRICA

Al detectarse concentraciones elevadas de PREG en el nervio ciático humano, se confirmó la síntesis de este compuesto en nervios periféricos (Morfin et al., 1992). Igualmente, en el nervio ciático de ratas, se ha reportado concentraciones de PROG y PREG 10 veces mayores que en plasma (~10 ng/g), niveles que no se redujeron con la extirpación de gónadas y glándulas adrenales (Koenig et al., 1995; Baulieu 1996,1997). Por otra parte, estudios in vitro demostraron que las neuronas inducen la vía biosintética de PROG en las CS, al verificar que al cultivarlas previamente con neuronas ganglionares de la raíz dorsal (DRG), contenían la enzima 3β -HSD, que convierte PREG a PROG (Baulieu et al., 1997). Estos resultados demostraron que las CS sintetizan neuroesteroides, incluyendo PREG, PROG y sus metabolitos reducidos (Koenig, 2000).

La PROG regula las funciones de las CS mediante mecanismos autocrinos (Baulieu, 2000; Engel, 2001) y además de sintetizar PROG, también expresan el receptor intracelular para ese neuroesteroide (R-progesterona), como ha sido demostrado por la unión de ligandos selectivos en la RT-PCR, utilizando iniciadores complementarios de ligandos, que se unen a los dominios de los R-progesterona de la rata (Baulieu et al., 1997, 2000; Zorumski, 2000).

1.4 NEUROESTEROIDES EN GLIOSIS REACTIVA

Las lesiones del SNC activan las células gliales que contribuyen a la formación de la cicatriz glial, cuya presencia resulta desfavorable en la regeneración y remielinización axonal (Fawcett et al., 1999; Biagini et al., 2013). En la gliosis reactiva intervienen células de microglía, astrocitos, precursores de oligodendrocitos y células meníngeas; en conjunto producen moléculas inhibitorias para la regeneración axonal (Fawcett y et al, 1999; Streit et al., 1999). Esta respuesta glial, es modulada por hormonas gonadales, neuroesteroides y otras sustancias extracerebrales provenientes de la circulación sistémica (García-Segura et al., 1994; García-Estrada et al., 1998).

Las células gliales expresan receptores para hormonas gonadales (Jung-Testas et al., 1996; Baulieu, 2000; Engel, 2001; Biagini et al., 2013) y son capaces de inhibir la gliosis post-traumática cerebral. La administración sistémica de testosterona en ratas machos, inhibe la proliferación de astrogliá en la corteza cerebral y el hipocampo lesionado por una herida penetrante; en hámsteres machos ésta hormona inhibe los niveles de ARNm para GFAP en el NMNF lesionado por aplastamiento del nervio facial, en la salida del foramen estilomastoideo (Jones y et al, 1996, 1997). Además, en ratas hembras, el 17 β -estradiol y PROG tienen efectos similares (García-Estrada et al, 1993).

Estudios in vivo e in vitro demostraron que los neuroesteroides PREG, PROG o DHA, reducen la gliosis reactiva en el tejido cerebral de ratas machos, esto

indica que la producción cerebral de neuroesteroides, contribuye en la respuesta regenerativa y en los mecanismos de reparación cerebral modulada por astrogliosis, sin embargo, de los neuroesteroides estudiados en tejido cerebral, la DHA fue el inhibidor más potente de la proliferación astrogliosis (Jones, 1996; García-Estrada et al 1998; Friess, 2000; Brinton, 2013; Luoma et al 2012).

Es interesante conocer el mecanismo de regulación de gliosis reactiva por neuroesteroides, debido a que el tejido glial en el SNC de mamíferos ha sido considerado esencial, para que suceda la regeneración axonal (Le Roux et al 1996; Colciago et al., 2016). Por su parte, la cicatriz glial forma una barrera física que evita el crecimiento axonal y producen varias moléculas como los proteoglicanos, que inhiben el crecimiento neurítico central (Bovolenta et al., 1992; Le Roux et al., 1996; Brinton, 2013). Los resultados favorables de los neuroesteroides al inhibir la cicatriz glial, pueden proponerse para facilitar la regeneración axonal del SNC (Del Cerro et al., 1995; García-Estrada et al 1998; Bielecki et al., 2016), en particular, en la reparación de nervios.

1.5 VITAMINA D

La vitamina D (VD) es un grupo de hormonas, que incluyen la VD 2 o ergocalciferol y la VD 3 o colecalciferol. La VD se adquiere principalmente por la exposición de la piel a la luz solar y por la ingesta alimentaria.

Biológicamente inactiva, la vitamina D sufre bioactivación por doble hidroxilación en hígado y riñón, dando lugar a la formación de 1,25-dihidroxitamina D (1,25-D, calcitriol, soltríol) – las principales formas biológicamente activas que forman la vitamina D. Sus funciones biológicas incluyen la regulación de la homeostasis mineral, la proliferación de tejidos, la diferenciación, la apoptosis, así como el sistema inmune (DeLuca HF. et al 2005). 1,25-D regula la expresión de numerosos genes a través del receptor de la vitamina D (VDR), perteneciente a una familia de receptores de esteroides que también incluye esteroides, glucocorticoides y receptores de ácido retinoico. Comparte mecanismos genómicos similares a otras hormonas esteroideas. Al unirse el 1,25-D, el VDR sufre un cambio conformacional y la Vitamina D se liga a la respuesta de elementos de ADN con el promotor de genes diana, controlando su transcripción.

La respuesta rápida a la vitamina D utiliza un efecto no genómico de señales de transducción y se cree que se produce por medio de receptores de membrana putativos (Chaudhuri A. et al 2005). Existe evidencia por autorradiografía de que la vitamina D es vinculante al cerebro (Stumpf WE. et al 1988) y la importancia

biológica de esta hormona en el sistema nervioso central (SNC) es ahora reconocida (Prufer K. et al 1999). Esta evidencia va ligada a la correlación de vitamina D, sus receptores (VDR) y enzimas de bioactivación / metabolismo en neuronas, células gliales, macrófagos cerebrales en el encéfalo y los nervios periféricos, que confirma su papel como autocrino o paracrino.

La vitamina D es un esteroide neuroactivo, cumpliendo así los criterios para un neuroesteroide (Stumpf WE. et al 1982; Prufer K. et al 1999). Ya varias revisiones discuten el papel de la vitamina D en funcionamiento y desarrollo del cerebro (Kalueff AV. et al 2004; 2006).

1.5.1 LA VITAMINA D Y EL SISTEMA NERVIOSO

Hay numerosos datos que vinculan la vitamina D y VDR con la regulación del comportamiento, además de alterar la morfología del cerebro, neuroquímica y fisiología. VDR se encuentran en las principales áreas del cerebro, incluyendo la corteza, el cerebelo y el sistema límbico, todos conocidos en la regulación del comportamiento (Stumpf WE. et al 1982; Walbert T. et al 2001). En los seres humanos, la deficiencia de vitamina D acompaña de irritabilidad, ansiedad, depresión, psicosis y defectos en la salud mental y en el desarrollo, (Stio M. et al 1993; Gloth FM. et al 2001; Ozer S. et al 2004; Cannell J, 2017). Los efectos psicotrópicos de elevación del estado de ánimo de la vitamina D también han sido bien documentados en la literatura (Stumpf WE. et al 1989; Gloth FM. et al 2001; Vieth R. et al 2004). Stumpf y Privette (Stumpf WE. et al 1989 and 1991)

sugieren que la vitamina D desempeña un papel único en la regulación de los ritmos estacionales y se conocen efectos de esta hormona en la depresión estacional (Gloth FM. et al 2001). Es importante destacar que los genes VDR humanos son altamente polimórficos y sus variaciones se producen frecuentemente en la población. La vitamina D cuenta con una relevancia en la esclerosis múltiple (EM) y en patología desmielinizantes. Existen reportes de que la radiación y la hipovitaminosis D, puede ser un factor importante en riesgo en mujeres para la EM (Munger KL. et al 2004; Matias-Guiu et al 2016).

Estos datos sugieren que la suplementación dietética con vitamina D puede prevenir el riesgo de EM, mientras que la terapia temprana con vitamina D es efectiva en el tratamiento del trastorno progresivo.

1.5.2 TRANSPORTE PLASMÁTICO DE LA VITAMINA D Y TRANSFORMACIÓN A METABOLITOS ACTIVOS

La VD circula asociada a una proteína específica, a albúmina y de forma libre, su proteína específica es la proteína de unión de la VD (DBP). La fracción libre de la VD representa una parte reducida de los metabolitos circulantes, aproximadamente menos del 1%, y puede tener una función biológica diferente de la fracción ligada a proteínas (Bikle D et al 1984, 1985). Bajo estos parámetros, los conceptos de suficiencia o deficiencia de VD no son fáciles de definir porque, además, la concentración plasmática de 25(OH)D circulante varía dependiendo de distintos estados fisiológicos o patológicos y bajo la influencia

de factores genéticos (Powe CE et al 2013). La VD utiliza proteínas transportadoras, DBP o albúmina, que permiten que acceda a diversas células y tejidos. La DBP se produce en el hígado y además del transporte participa en la liberación del metabolito con el objetivo de facilitar la conversión de la prohormona 25 hidroxivitamina D (25[OH]D), que es circulante, pero carece de actividad, al metabolito 1,25-dihidroxivitamina D (1,25[OH]2D), que es el metabolito activo. Para ello, es necesaria la actuación de la 25-hidroxi-vitamina D-1- hidroxilasa, que también es conocida como citocromo p450 27B1 (CYP27B1) o como 1-hidroxilasa y es codificada por el gen CYP27B1. Esta enzima está localizada en el túbulo renal y en otros tipos celulares, como células inmunitarias y del sistema nervioso central (SNC), y cataliza la hidroxilación de 25(OH)D a 1,25(OH)2D. Este metabolito actúa sobre el receptor nuclear de 1,25(OH)2D, el receptor de VD (VDR). Como ya se ha señalado previamente, el 99% de 25(OH)D circula unida a DBP o a la albúmina (Cooke NE et al 1989), mientras que sólo existe una pequeña parte que circula de forma libre (Bouillon R et al 1981). Debido a que 25(OH)D es lipófila, tiene la capacidad de difundirse de forma pasiva a través de las membranas celulares. La idea de que la fracción libre, como ocurre con otras hormonas, es la forma activa está muy cuestionada, debido a que las concentraciones de la fracción libre de 1,25(OH)2D en el suero son aproximadamente 10—13M (Vieth R et al 1994) más bajas (casi 1.000 veces) que las necesarias para la unión con VDR. Además, por el importante papel que se ha demostrado de la megalina, también denominada low density lipoprotein related protein 2 (LRP2). Esta proteína transmembrana actúa como receptor multiligando y se une a la BDP generando un compuesto que será

internalizado a través de endocitosis en las células del túbulo renal proximal, donde se halla la 1-hidroxilasa.

La megalina se comporta como receptor endocítico que se une a ligandos extracelulares que por endocitosis son internalizados, tras lo cual se activan determinadas vías de señalización que afecta a lipoproteínas, hormonas, fármacos y a la propia DBP, y que dependen de la unión con unas proteínas adaptadoras que reconocen determinadas zonas citoplasmáticas de megalina. (Christ A et al 2012). Las funciones donde estas vías actúan influyen en el tráfico de proteínas (Wolff NA et al 2008), la interacción con proteínas del citoesqueleto o citoplasmática o su participación en la señal SHH (Christ A et al 2012). La megalina puede ser fosforilada por GSK3, PKC, CK- II o PKA para su reciclaje desde los endosomas (Yuseff MI et al 2007). Los ratones deficientes en megalina desarrollan un fenotipo que se asemeja en el hueso al raquitismo que se observa en los ratones deficientes en VD (Christensen EI et al 2001). Además, junto a la megalina, hay dos proteínas más que actúan en la unión a DBP, que son la cubulina (Assemat E, et al 2005; Nykjaer A et al 2001) y la proteína adaptadora Dab2 (Morris SM et al 2002). Aparte del riñón, la megalina se expresa en varios tejidos, tales como glándulas paratiroides, glándula mamaria y placenta, compartiendo estos tejidos con el sistema nervioso estos mecanismos.

En el cerebro sano, la megalina se ubica principalmente en el epéndimo que recubre la pared ventricular, los capilares y el plexo coroideo (Chun J et al 1999; Landowski et al., 2016), además se han hallado en el SNP y SNC. La

deficiencia en el gen que codifica la megalina produce una alteración en el desarrollo del cerebro anterior, con la ausencia de aparato olfativo y malformaciones cráneo-faciales (Zarbails K. et al 2004). En el SNC, la megalina se expresa en neuronas y astrocitos (Bento-Abreu A. et al 2008). En astrocitos, la megalina es necesaria para poder internalizar albúmina que es requerida para las señales que conducen a la síntesis de factores neurotróficos por neuronas vecinas (Bento-Abreu A. et al 2009). En las células ganglionares de la retina interactúa con la metalotioneína-IIA permitiendo la activación de diferentes vías de señalización intracelular implicadas en la neuroprotección (Fitzgerald M. et al 2007; Louma et al., 2012). En el cerebro, la megalina participa en la endocitosis e internalización de apolipoproteína E y la proteína precursora de amiloide (APP). Se ha observado que la megalina está sobrerregulada en neuronas afectadas en la enfermedad de Alzheimer (LaFeria F. et al 1997).

1.5.3. INTERNALIZACIÓN DE LOS METABOLITOS DE LA VITAMINA D

El mecanismo de unión DBP-megalina es la forma de internalizar los metabolitos de la VD en muchos tejidos y, si la fijación a la DBP es muy alta, habrá una mayor cantidad de metabolitos de la VD disponibles para ello y una menor fracción libre que pueda internalizarse a través de una difusión pasiva. De manera que el nivel de DBP influye en la disponibilidad de fracción libre de VD y, en consecuencia, un aumento de niveles circulantes de VD puede suponer una menor fracción libre disponible. Por el contrario, una menor concentración

de DBP podría aumentar las concentraciones de metabolitos «libres» de VD en la membrana celular, lo que facilitaría la difusión pasiva de estas moléculas. Este concepto no es tan estricto porque podría ser posible que para algunas células hubiera mecanismos de internalización de DBP con la unión a otras proteínas que no sean la megalina y que internalizaran los metabolitos de VD fijados y no libres (Chun RF. et al 2014). En este sentido, la absorción de 25(OH)D en los linfocitos B se puede realizar desde la molécula fijada a DBP al margen de la megalina y también a través de la unión de DBP a proteínas receptores Fc gamma, que también se asocian a inmunoglobulinas. A pesar de ello, hay tejidos que no expresan megalina, lo que indica que en estos tejidos se internaliza la 25(OH)D libre. Esta posible actuación de la 25(OH)D libre se plantea especialmente en las células inmunitarias (como monocitos, macrófagos y células dendríticas entre otros). Estudios in vitro han demostrado que los monocitos expuestos a dosis crecientes de 25(OH)D en presencia de DBP muestran inducción dependiente de la dosis de las proteínas antibacterianas, pero, en ausencia de DBP, esta respuesta es mucho más potente y, en consecuencia, la capacidad de 25(OH)D para promover la actividad antibacteriana de monocitos es dependiente tanto de la concentración de suero y el genotipo de DBP (Chun RF. et al 2014). Observaciones similares también se han observado con células T reguladoras.

El concepto de que la internalización en la mayoría de las células inmunitarias es independiente de la megalina es importante, porque implica que el acceso de los metabolitos de la VD a estas células podría depender o de la

unión a receptores Fc gamma o de la fracción libre de la VD, que tiene una relación inversa con las concentraciones plasmáticas de DBP y, en consecuencia, a las concentraciones plasmáticas circulantes de VD, y es la situación opuesta a las células del SNC que sí utilizan la internalización por megalina (Bouillon R. et al 1980). De esta forma, podría hipotetizarse que un nivel bajo de DBP podría suponer una internalización alta a las células inmunitarias y opuesta a las células del SNC.

1.5.3.1 EL RECEPTOR DE VITAMINA D

El metabolito de la VD que se une al VDR es el 1,25(OH)₂D, que es de tipo receptor nuclear. En situaciones patológicas, el VDR puede distribuirse principalmente en el citoplasma (Nagpal S. et al 2005). Cuando se produce la interacción del VDR con su ligando 1,25(OH)₂D se produce la formación de 2 superficies de interacción donde participan proteínas independientes e interactúa con el receptor retinoide X (RXR) necesario para la unión con el ADN, que se requiere para el reclutamiento de correguladores necesarios para la modulación genética (Pike JW. et al 2012).

La unión 1,25(OH)₂D-VDR se dimeriza con RXR y se transloca al núcleo donde se une a elementos de respuesta a la VD (VDRE) que actúan con los genes de respuesta a la VD.

Los genes diana pueden ser coactivadores o correpresores y a través del complejo VDR/RXR se produce una inducción o represión de la transcripción en el que participan ATPasas y proteínas involucrados en el reclutamiento de la ARN polimerasa (Haussler MR. et al 2013). Además de este mecanismo se relaciona con VDRE, VDR y puede inhibir genes antagonizando factores de transcripción (Alroy I. et al 1995; Takeuchi A. et al 1998).

Existen variantes alélicas del gen VDR y se han descrito un aumento en la susceptibilidad de determinadas infecciones y un incremento en la incidencia de enfermedades autoinmunes, como la EM y el cáncer.

1.6 METABOLISMO DE LA VITAMINA EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la VD participa en el metabolismo óseo, su presencia en el SNC indica que actúa en algunas de sus funciones, incluso es considerada como un neuroesteroide (Groves NJ. et al 2014). La 25(OH)D se encuentra en el LCR de pacientes con EM y en los sujetos de control y se correlaciona positivamente con 25(OH)D sérico (Holmoy T. et al 2009), y los niveles de DBP también están presentes en el LCR de controles y son más prevalentes en los pacientes con EM (Dumont D. et al 2004). Esto confirma que la VD y su principal proteína transportadora acceden al SNC. En modelos experimentales de EAE, se ha demostrado un aumento en la expresión de mRNA-VDR y de mRNA-CYP27B1 en el SNC frente a controles (Spach K. et al 2005). Teniendo en cuenta que la expresión de VDR y CYP27B1 está presente en neuronas y astrocitos de donantes sanos, se podría formular la hipótesis que la VD puede tener acciones específicas sobre el SNC (Eyles D. et al 2005). En este sentido, ha sido descrito que en cultivos in vitro de células gliales suplementados con 1,25(OH)₂D₃ la glía muestra efectos inflamatorios (Smolders J. et al 2011) lo que apoyaría un potencial terapéutico en la EM. Considerando que 1,25(OH)₂D puede atravesar la barrera hematoencefálica y que la mayoría de las células del SNC, incluyendo la microglía (Zhang Y. et al 2014), expresan VDR, la idea de una acción directa de la VD sobre el SNC es una posibilidad y recientemente se ha señalado la acción de la VD sobre las

histonas generando una alteración epigenética (Pareira F. et al 2012), que ha sido relacionada con la EM (Prüfer K. et al 1999; Kúćukli C. Et al 2015). Como se ha descrito, VDR se hallan presentes en neuronas y glía (Naveilhan P. et al 1993; Veenstra TD. et al 1998), VDR y CYP27B1 están expresados en neuronas y astrocitos de personas sanas (Eyles DW. et 2005).

En ratas hembras con EAE, se observó que 1,25(OH)₂D₃ incrementa la expresión de nRNA-VDR y mRNA-CYP27B1 en comparación con los controles (Dumont D. et al 2004). Se produce un aumento de la expresión de mRNA-CYP24A1 por la exposición a la 1,25(OH)₂D en el cultivo de la línea celular astrocitoma C6 y en el cultivo de astrocitos procedentes de rata (Naveilhan TD. et al 1993). La expresión de CYP24A1 en macrófagos es modificada por IFN (Dusso AS. et al 2007).

Se ha observado asimismo una reducción de la producción de TNF y de interleucina-1 en una línea celular de microglía expuesta a 1,25(OH)₂D (Lefebvre d'Hellencourt C. et al 2003) y una reducción de nRNA-TNF y del mRNA del factor estimulante de colonias de macrófagos en cultivo células primario de astrocitos de rata y en una línea celular de astroglioma (Furman I. et al 1996). Asimismo, la inmunorreactividad de MHC clase disminuye en la EAE después del tratamiento con 1,25(OH)₂D (Garcion E. et al 2003).

Es especialmente interesante el artículo de Smolders y cols. (Smolders J. et al. 2013) porque permite extrapolar la presencia del metabolismo de la VD en

el SNC sano y en la EM. Estos autores confirman la expresión nuclear de VDR en todas las neuronas, incluso en hipotálamo. La CYP24A1 está expresada en el citoplasma de prácticamente todas las neuronas, incluido el hipotálamo, pero sobre todo en los núcleos supraóptico y periventricular, y en el hipotálamo colocaliza con cortisol releasing hormone (CRH), vasopresina y oxitocina. En la sustancia blanca normal, en pacientes y en controles se halla la actividad nuclear de VDR en oligodendrocitos (OL).

También hay expresión de VDR en la microglía, pero no de CYP24A. En astrocitos se observa tanto la expresión de VDR nuclear como CYP24A citoplasmática. Sin embargo, en algunos pacientes se halla la expresión de VDR en citoplasma, especialmente en aquellas células gliales que tienen mayor expresión de GFAP (Naveilhan P. et al 1993). En la sustancia blanca de apariencia normal, la expresión glial de mRNA-VDR y de mRNA-CYP27B1 no varía frente a lo que se halla en células mononucleares periféricas, mientras que la expresión de mRNA-CYP24A1 y mRNA-LRP2 están aumentadas en los controles. En la EM, la expresión de mRNA-VDR está aumentada significativamente frente a controles, mientras que las expresiones de mRNA-CYP24A1, mRNA-CYP27B1 y mRNA-megalina no varían. Asimismo, estos autores hallan expresión de VDR citoplasmático en la glía en el centro de las lesiones de EM crónicas no activas y en algunas células hay un anillo perilesional con expresión de VDR. La expresión de mRNA-VDR y mRNA-CYP27B1 es mayor en las lesiones crónicas que muestran actividad frente a la sustancia blanca a normal. No hay diferencias, sin embargo, entre las lesiones crónicas no

activas con la sustancia blanca aparentemente normal. La expresión de mRNA-megalina está disminuida en las lesiones crónicas activas o no frente a la sustancia blanca aparentemente normal.

Smolders y cols, incluyen en su artículo una serie de experimentos in vitro que muestran el efecto de la adición de VD a determinadas líneas celulares relacionadas con el SNC. Así, la adición in vitro de 1,25(OH)2D3 en un cultivo con la línea celular SH-SY5Y de neuroblastoma, que incluye básicamente neuronas, induce la expresión de mRNA-CYP24A.

La adición de 1,25(OH)2D3 a cultivos in vitro a una línea celular de astrocitos humanos primarios y a líneas celulares de astroglioma (U343 y U373) mostraron la sobreexpresión dependiente de la dosis de mRNA-VDR y de mRNA-CYP24A1 pero no se produjo un efecto sobre la expresión de mRNA-CYP27B1.

En un cultivo primario de astrocitos y en un cultivo de microglía se añadieron IFN-, TNF y 1,25(OH)2D3. El IFN-y el TNF sobreexpresaron mRNA-CYP27B1 en la microglía y los astrocitos. Tanto en las células tratadas con IFN-y TNF, la adición de 1,25(OH)2D3 supuso que el incremento en la expresión de mRNA-CYP27B1 fue menor que sin añadir 1,25(OH)2D3. La sobreexpresión de CYP27B1 y CYP24A1 producida por IFN-/TNF y 1,25(OH)2D3 fue más pronunciada en astrocitos que en microglía. A través de estudios inmunohistoquímicos han localizado megalina en el endotelio de la

microvasculatura cerebral y el plexo coroideo (Zheng G. et al 1994) y, por tanto, debe plantearse que la DBP y la VD acceden al SNC a través de la megalina y se ha hallado que la expresión de mRNA-megalina está disminuida en las lesiones de MS, tanto activas como inactivas. El mecanismo por el cual 1,25(OH)₂D favorece la diferenciación neuronal no está claro, pero probablemente sea actuando sobre factores de crecimiento, habiéndose observado cómo 1,25(OH)₂D sobrerregula la expresión de NT-3 y NGF (Brown J. et al 2003), así como GDNF (Naveilhan P. et al 1996), CNTF o BDNF (Fulmer C. et al 2014).

2. NEUROGÉNESIS ADULTA

2.1 ORIGEN DE LA NEUROGÉNESIS ADULTA

A principios del siglo XX, científicos como Santiago Ramón y Cajal (Ramón y Cajal, 1904), postulaban que el Sistema Nervioso Central era incapaz de regenerarse en la vida postnatal. Cabe mencionar que, en este tiempo, estas afirmaciones tenían sus fundamentos metodológicos en el análisis histológico de tejidos mediante técnicas de tinciones argénticas o de anilinas (Nissl), por lo que estas observaciones eran coherentes para su época. La mayor parte de los investigadores de principio de siglo pasado, describían las neuronas como células con arborizaciones dendríticas, pero si en el análisis de su morfología se evidenciaban alteraciones en su tamaño (eran células pequeñas), se las consideraban como células indiferenciadas o, si existía alguna duda, se clasificaban directamente como artefactos de la preparación histológica.

Los primeros datos sobre neurogénesis adulta en mamíferos, proceden de investigaciones que se realizaron hace más de tres décadas en roedores, donde se demostró la existencia de dos zonas diferenciadas donde las células se dividían y producían neuronas (Altman, 1962, 1969). Pero esta idea no fue aceptada hasta la última década del siglo XX, reconociéndose la existencia de células con capacidad de originar diferentes estirpes de células nerviosas (Reynolds et al., 1992, Doetsch, 2002).

2.2 NEUROGÉNESIS Y GLIOGENESIS ADULTA

Actualmente podemos definir la neurogénesis adulta como un proceso de generación de neuronas funcionales a partir de las células progenitoras, incluyendo la proliferación y diferenciación neuronal específica de los progenitores neuronales, además de la maduración e integración funcional de las neuronas en sus circuitos (Ming y Song, 2005).

En el transcurso de la evolución de las especies, la tasa de neurogénesis en el cerebro adulto ha disminuido, mientras que se ha incrementado la complejidad cerebral. Así, los vertebrados inferiores pueden regenerar tejidos y/o regiones enteras del cerebro, mientras que en los vertebrados superiores, esta regeneración está confinada a pocas zonas cerebrales (Kempermann et al., 2004). La neurogénesis adulta ha sido descrita en diferentes vertebrados, como peces (Zupanc y Horschke, 1995), reptiles (López-García, 1988; Pérez-Cañellas, 1996), pájaros (Barnea y Nottebohm, 1994; Alvarez-Buylla et al., 1998), roedores (Altman y Das, 1965), primates (Gould et al., 1997; Pencea et al., 2001; Mirescu y Gould, 2004; Kempermann et al., 2004) e incluso en humanos (Eriksson, 1998).

2.3 NICHOS CLÁSICOS DE PROLIFERACIÓN EN EL CEREBRO ADULTO

Las regiones a las que llamamos neurogénicas dentro del cerebro, lo son porque cumplen dos condiciones: en primer lugar, la presencia de células precursoras inmaduras a partir de las cuales pueden desarrollarse nuevas neuronas; y en segundo lugar, un microambiente que sea permisivo para que el proceso de neurogénesis tenga lugar. Hasta el momento, en el cerebro de los mamíferos adultos se han descrito principalmente dos zonas responsables de la neurogénesis que son: los bulbos olfatorios y el hipocampo. Resulta interesante destacar que no siempre existe correlación topográfica entre la existencia de células madre y la aparición de nuevas neuronas. Así, mientras en el hipocampo las células madre y las nuevas neuronas coexisten, en la otra región, el bulbo olfatorio, las nuevas neuronas proceden de la zona que rodea los ventrículos laterales, denominada zona subventricular (SVZ) (Lois et al., 1994), concretamente en la pared lateral del ventrículo. Desde esta región, las nuevas células tienen que migrar hasta alcanzar el bulbo olfatorio, constituyendo el camino migratorio rostral (RMS, del inglés Rostral Migratory Stream), que en ratones tiene entre 5 y 6 milímetros de recorrido (Lois et al., 1994) y una vez situadas en el bulbo olfatorio se diferencian a neuronas. Actualmente, también sabemos que existe una migración hacia el cuerpo calloso, donde preferentemente se diferencian en oligodendrocitos (Menn et al., 2006; Ortega et al., 2012).

2.3.1 ZONA SUBVENTRICULAR

A partir de estudios de microscopía electrónica, reconstrucciones celulares y diversos marcadores moleculares, se ha establecido en roedores la organización precisa de la SVZ (Doetsch et al., 2002), como el primer paso para la identificación de la célula madre (Fig. 3). De este modo, se han encontrado cuatro tipos celulares (Doetsch, 1997; Álvarez-Buylla y Lim, 2004) que son los siguientes:

- Las células A (Migradoras)

Son las neuronas inmaduras (neuroblastos). Poseen un proceso apical largo en un extremo y otro generalmente corto, en el polo opuesto. Estas células son incapaces de autorrenovarse.

Suelen aparecer en grupos o rosetas de células formando cadenas, separadas por espacios extracelulares para facilitar la movilidad. También se expresan marcadores específicos como PSA-NCAM (“Polysialated Neural Cell Adhesion Molecule”), Tuj-1 (beta tubulina III) y así como el factor de transcripción Dlx-2.

- Las células B (Astrocitos)

Correspondientes a las células precursoras primarias (o células madres), poseen una gran capacidad para dividirse que les permite formar neuroesferas in vitro. Al

dividirse, pueden dar lugar a otra célula igual a la madre o generar unas células transitorias con elevada tasa de división, llamadas células C. Los astrocitos son positivos para marcadores de proteínas de filamentos intermedios: vimentina, nestina y GFAP (proteína de la glía fibrilar acídica). En la actualidad las células B se dividen en dos subtipos:

- Astrocitos tipo B1: que contactan con la cavidad ventricular mediante un cilio corto y rectilíneo, llamado cilio primario, que se extiende a través de otro tipo celular, las células tipo E, para contactar con el lumen del ventrículo.
- Astrocitos tipo B2: no contactan con la cavidad ventricular.

A partir de las células tipo B se genera una pequeña población positiva para NG2, generadora de oligodendrocitos (OPCs), además sabemos que algunas células B y C son positivas para marcadores de oligodendrocitos en estadios iniciales, lo que sugiere que la diferenciación a oligodendrocito en la SVZ se da tempranamente en el linaje de las células madre. Estas se comprometen cada vez más hacia oligodendrocito formando una población de células positivas para Olig2, PDGFR (platelet derived growth factor receptor), PSAN-CAM y negativas para tuj1, y que migra hasta el cuerpo calloso, el estriado y el fórnix donde se diferencian a oligodendrocito (Menn, García-Verdugo et al. 2006; El Waly et al., 2014). Otros estudios apoyan esta afirmación ya que se ha visto que algunas células B también presentan el receptor para PDGF (PDGFR α) necesario para la generación de oligodendrocitos en la SVZ. La expresión de PDGFR α en las células B ocurre tempranamente en el linaje de células madre y

se piensa que puede regular el balance entre la generación de neuronas u oligodendrocitos (Jackson, García-Verdugo et al. 2006).

- Las células C (Precursores)

Son las células precursoras ya que se dividen de forma rápida y transitoria, dando lugar a células de tipo A (Fig.3), y se caracterizan por ser el tipo celular con mayor tasa proliferativa de la SVZ. Se encuentran formando grupos de dos o tres células adheridas a las cadenas de células de tipo A. Son también positivas para el factor de transcripción Dlx-2 como las células tipo A, pero se diferencian de ellas por ser negativas para el marcador PSA-NCAM.

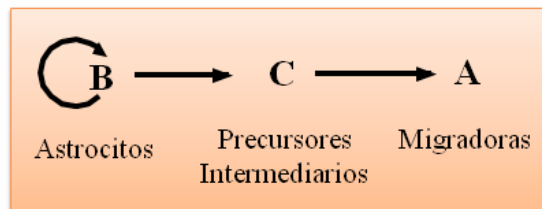
- Las células E (Ependimarias)

En este tipo celular no se han observado procesos mitóticos, pero poseen un papel importante en los nichos neurogénicos y en la migración de las nuevas neuronas al bulbo olfatorio.

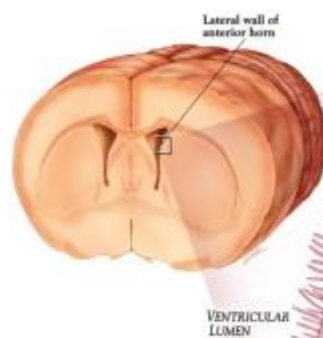
Inmunohistoquímicamente, este tipo de células son positivas para vimentina, S-100 y CD-24. Pueden describirse dos tipos diferentes:

- Células Ependimarias E1: estas células poseen muchos cilios y microvellosidades (Mirzadeh et al., 2008).
- Células Ependimarias E2 (células biciliadas): su característica más distintiva son sus largos cuerpos basales, además poseen únicamente dos cilios, parcialmente invaginados (Mirzadeh et al., 2008).

A



B



C

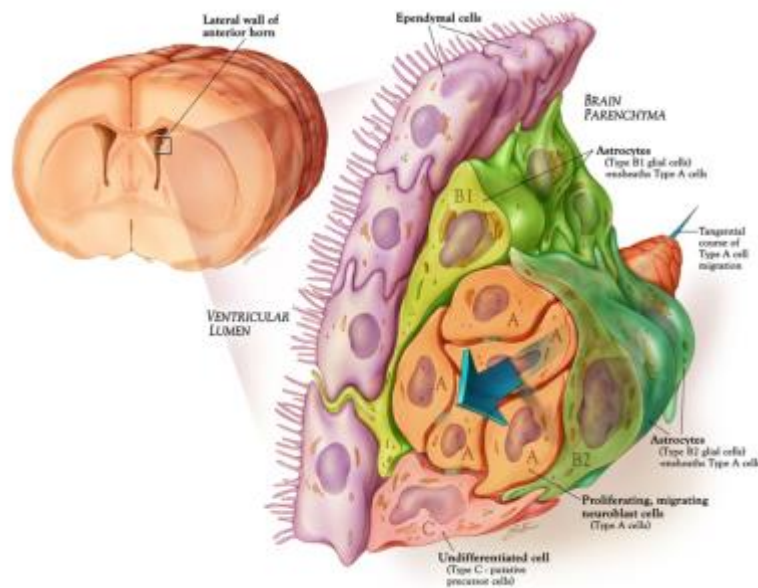


Figura 3. Neurogénesis adulta en la SVZ. (A) Estirpe celular de la SVZ (Álvarez- Buylla y Lim, 2004). (B) Sección coronal de cerebro de roedor adulto. Se marca el ventrículo lateral y la parte que se amplía. (C) Arquitectura de la SVZ, las células B (verdes), son los astrocitos, los de tipo B1 están en contacto con la cavidad ventricular, mientras que los astrocitos tipo B2 no contactan con esta cavidad. Las células C (rojas), de división rápida. Y las células A (naranja), que corresponden a los neuroblastos migradores al BO. Por último, las células moradas son las endimarias. (Imagen tomada de Quiñones-Hinojosa et al., 2006)

2.3.1.1 OLIGODENDROGÉNESIS EN LA SVZ

Los progenitores neurales (NSC) de la SVZ pueden crecer en suspensión celular en presencia de factores tróficos. Bajo estas condiciones *in vitro* las NSC forman estructuras esféricas llamadas neuroesferas que contienen células que no sólo pueden renovarse, si no también diferenciarse en neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Reynolds y Weiss, 1992; Vescovi et al 1993, Gritti et al., 1996). Sin embargo, en condiciones normales, la producción de oligodendrocitos en la SVZ es escasa (Menn et al., 2006). Curiosamente, las lesiones desmielinizantes en la sustancia blanca vecina pueden aumentar significativamente la generación de OPC de progenitores SVZ (Nait-Oumesmar et al., 1999; Picard-Riera et al., 2002; Menn et al., 2006).

Como se ha comentado anteriormente las células tipo B en la SVZ son también los progenitores primarios de los nuevos oligodendrocitos (Menn et al., 2006). Esto se demostró marcando astrocitos SVZ en ratones transgénicos (ratones GFAP-tva) que expresan el receptor de un retrovirus aviar (RCAS) bajo el control del promotor GFAP (Holland y Varmus, 1998). Usando estos ratones transgénicos, los derivados de linaje de los astrocitos divididos pueden ser rastreados usando retrovirus RCAS aviares que llevan un gen reportero hereditario; estos astrocitos de la SVZ y su progenie están permanentemente etiquetados con este método y son capaces de generar oligodendrocitos que migran al cuerpo calloso y los tractos de materia blanca en el estriado y fimbria fórnix (Menn et al., 2006). Es interesante señalar que los astrocitos SVZ, pero no

los astrocitos parenquimatosos, pueden generar oligodendrocitos *in vivo* (González-Pérez y Quiñones-Hinojosa, 2010).

La oligodendrogénesis en la SVZ parece estar mediada por los precursores (célula tipo C) que expresa el factor de transcripción Olig2 (Hack et al., 2005; Menn et al., 2006), que codifica el factor de transcripción hélix-loop-helix que son cruciales en la generación de OPC (Rowitch, 2004). En el cerebro adulto, se ha descrito la expresión de Olig2 en OPCs y oligodendrocitos maduros en la sustancia blanca (Ligon et al., 2004, Rowitch, 2004). Las células de tipo C que expresan Olig2 pueden dar lugar a OPC altamente migratorios que salen de la SVZ y pueblan el cuerpo calloso, estriado y fimbria, donde se diferencian en glia NG2 y oligodendrocitos mielinizantes (Ernst et al., 2014) (Fig. 4). Sin embargo, el número de oligodendrocitos derivados de SVZ es limitado en comparación con el gran número de nuevas neuronas generadas por los astrocitos de tipo B. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la cantidad de oligodendrocitos producidos en la SVZ puede aumentarse por una lesión desmielinizante. Esto sugiere que las señales externas promueven la ganancia de función de Olig2 en la SVZ (Maire et al., 2010), que estimula la oligodendrogénesis y la mielinización (Nait-Oumesmar et al., 1999; Picard-Riera et al., 2002; Menn et al., 2006, González-Pérez et al., 2009). La infusión intracerebroventricular de Noggin, un antagonista endógeno BMP4, aumenta el número de oligodendrocitos derivados de la SVZ (Colak et al., 2008; Cate et al., 2010). La endotelina-1, una señal derivada de astrocitos, también regula la migración y diferenciación de OPC (Gadea et al., 2009). Estudios previos indican

que los aportes glutamatérgicos de los axones desmielinizados en el cuerpo calloso parecen señalar la migración de OPCs desde la SVZ y promueven la remielinización axonal (Etxeberria et al., 2010). De este modo, la SVZ adulta responde activamente a las lesiones desmielinizantes y aumenta el número de OPC generadas, lo que contribuye a la reparación de la desmielinización axonal.

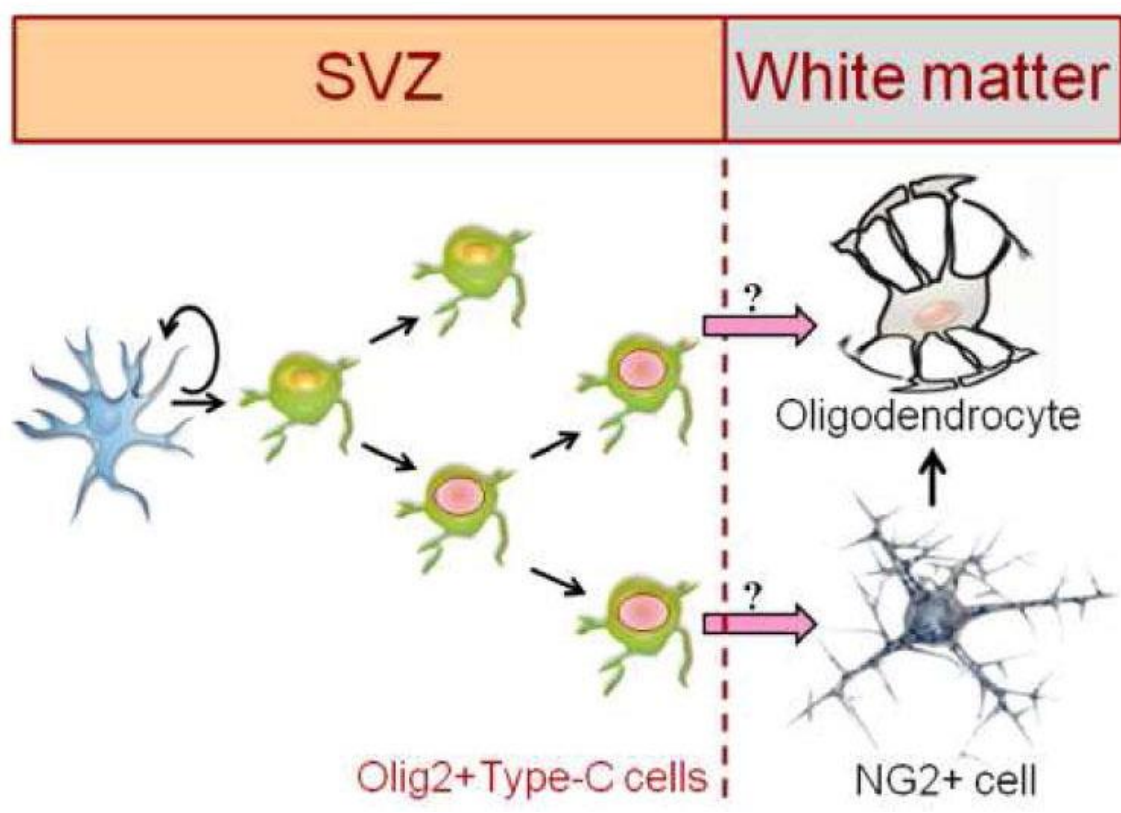


Figura 4. Oligodendrogenesis adulta en la SVZ. Las células de tipo B también pueden generar células precursoras de oligodendrocitos posiblemente a través de precursores intermedios similares a las células de Tipo C que expresan Olig2. Las células precursoras de oligodendrocitos derivadas de la SVZ migran largas distancias y se diferencian en células NG2 + y oligodendrocitos en el cuerpo calloso, estriado y fimbria fórnix. (Imagen tomada de González-Pérez & Arturo Álvarez-Buylla et al., 2011)

2.2.2 HIPOCAMPO

2.2.2.1. ORGANIZACIÓN DE LA FORMACIÓN HIPOCÁMPICA

La formación hipocámpica comprende seis regiones distinguibles citoarquitectónicamente, conectadas de forma unidireccional: el hipocampo, formado por el hipocampo propio y el giro dentado (separados por la fisura hipocámpica); el complejo subicular, formado por el presubiculum, el subiculum y el parasubiculum; y la corteza entorrinal (Amaral y Witter, 1989).

El giro dentado está formado por una capa de somas pequeños densamente empaquetados en columnas, stratum granulare (donde residen las células granulares, Gr) (Fig.3). Estas neuronas son de naturaleza glutamatérgica y poseen axones basales denominados fibras musgosas. En la capa más cercana a la fisura hipocámpica, stratum moleculare o capa molecular (Mol) (Fig.5), se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales. La capa más profunda del giro dentado, designada hilus, se caracteriza por su naturaleza polimórfica, compuesta por una gran variedad de tipos celulares (Amaral, 1978; Amaral y Witter, 1989). Entre el stratum granulare y el hilus se pueda distinguir una fina capa, la capa subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Altman y Das, 1965; Kaplan y Bell, 1984; Altman y Bayer, 1990; Seri et al., 2001).

El hipocampo propio o cuerno de Amón está dividido en tres áreas:

CA1 (Cuerno de Amón 1), CA2 (Cuerno de Amón 2) y CA3 (Cuerno de Amón 3). La zona más distal, designada CA1, se caracteriza por estar formada por células piramidales pequeñas, mientras la zona más proximal, formada por la CA2 y CA3, es rica en células piramidales de mayor tamaño.

Las distintas áreas están estratificadas (Fig.5). Así, en la capa más interna encontramos un estrato rico en fibras, el alveus o sustancia blanca. Luego, encontramos una capa estrecha, el *stratum oriens* (Or), formada esencialmente por las dendritas basales de las células piramidales, que conforman el *stratum pyramidale* (Py), de naturaleza glutamatérgica. A continuación, encontramos el *stratum radiatum* (Rad), formado por las dendritas apicales de las neuronas piramidales. En la parte más exterior (cercana a la fisura hipocámpica) encontramos el *stratum lacunosum moleculare* (LMol), que contiene las ramificaciones más distales de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Únicamente en el área CA3, entre los *stratums pyramidale* y *radiatum*, es posible encontrar un estrecho estrato acelular, formado por las dendritas apicales de las piramidales de CA3 y en el cuál se establecen conexiones con las fibras musgosas procedentes del giro dentado, el *stratum lucidem* (SLu) (Fig.5).

La corteza entorrinal se encuentra dividida en seis capas corticales bien definidas. Las capas II y III están densamente pobladas por pequeñas células que envían sus axones hacia el hipocampo. Las capas V y VI están formadas

por neuronas grandes que envían sus proyecciones fuera de la formación hipocámpica. Las capas I y IV son acelulares.

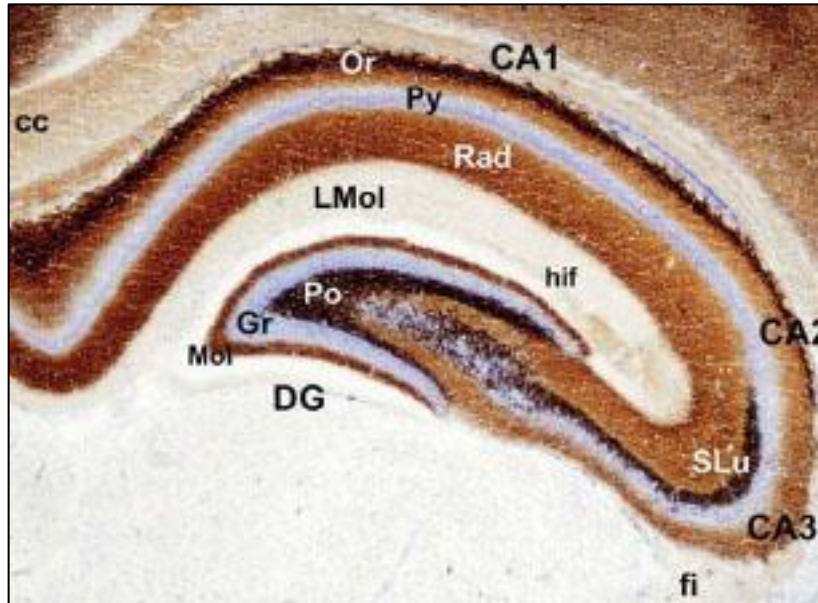


Figura 5. Microfotografía de una sección cerebral del hipocampo de ratón, teñido por la doble tinción de Timm-Nissl. En las regiones CA1-CA3 se identifican una serie de estratos celulares y fibrosos: oriens (Or), piramidal (Py), radiatum (Rad) y lacunosum moleculare (LMol). Únicamente, en la CA3, hay otra capa denominada stratum lucidum (SLu). En el giro dentado, justo por debajo de la fisura hipocámpica (hif), vemos la capa molecular (Mol), y hacia el interior la capa de células granulares (Gr), seguida de la capa polimorfa (Po). fi, fimbria; cc, corpus callosum. (figura extraída de Amaral y Witter, 1989).

2.2.2.2. TIPOS CELULARES

En el DG, la población de células precursoras reside en la capa SGZ (zona subgranular). La progenie de estas células en continua división migra distancias cortas hasta la capa granular (Fig.6). Una vez situadas en esta capa, estas células emiten las dendritas hacia la capa molecular, hasta contactar con las células granulares allí presentes con anterioridad, además de emitir su axón a lo largo de las fibras musgosas que van a contactar con la región CA3 del hipocampo. Después de un corto plazo de tiempo, estas células están

completamente integradas y son funcionales, por lo que no podrán diferenciarse de las que residían con anterioridad (Kempermann et al., 2015).

Se observan tres tipos celulares diferentes, la organización de los diferentes tipos celulares puede observarse en la Fig. 6. De este modo, en el DG, aparecen los siguientes tipos celulares:

- Las células tipo B (astrocitos)

Denominadas como las células madre neuronales y con capacidad de autorrenovarse. Su morfología es parecida a la de las células de la glía radial, poseen un soma triangular con un proceso apical que alcanza la capa de células granulares (Seri et al., 2001). Pueden diferenciarse dos tipos de astrocitos basados en su orientación en la SGZ:

- Astrocitos radiales (rAs): poseen un cuerpo celular grande, con forma redondeada, poligonal o triangular, con una fina lámina basal orientada tangencialmente a lo largo de la SGZ y una prolongación radial que crece profundamente en la capa molecular. Este tipo de astrocitos poseen más orgánulos, polirribosomas y brillantes mitocondrias que el otro subtipo astrocítico (Seri et al., 2004).
- Astrocitos horizontales (hAs): no poseen proyección radial pero extienden su arborización en paralelo a la capa SGZ y unas ramificaciones secundarias hacia el hilus y la capa granular. Su cuerpo celular es alargado (Seri et al., 2004).

Ambos subtipos astrocíticos son positivos para el marcador de astrocitos maduros GFAP, para el marcador de astrocitos inmaduros vimentina, y para la

proteína musashi que se une al RNA específico de astrocitos (Sakakibara y Okano, 1997). Además existen marcadores específicos de cada subtipo, así los rAs son positivos para la nestina y los hAs para la proteína S-100 β de unión a calcio (Seri et al., 2004).

- Las células tipo D

Son los precursores intermediarios en la formación de las nuevas neuronas granulares, y provienen de la división de las células As (Fig.6). Las células D aparecen, generalmente, formando grupos de dos a cuatro células del mismo tipo.

Pueden diferenciarse tres subtipos diferentes de células D según su ultraestructura y morfología:

- Células D1: son células pequeñas con forma redondeada, ovoide o de gota invertida. Generalmente no tienen prolongaciones en el plano de la SGZ.
- Células D2: posee una prolongación corta, a veces bifurcada. Se diferencian tres clases de células tipo D2 según la orientación de su proyección respecto a la capa granular: las células D2v, con su proyección orientada verticalmente, las de tipo D2h, cuya proyección es horizontal, es decir, paralela a la capa granular, y por último, las células D2i, con la prolongación invertida respecto a la capa granular, apuntando hacia el hilus.
- Células D3: poseen una arborización prominente, con una prolongación radial que se extiende a través de GCL hacia la capa molecular (ML), y unas finas proyecciones hacia el hilus.

Estas células, renombradas por algunos autores como células progenitoras neuronales amplificadoras (Encinas et al., 2006, Balu et al., 2008), con frecuencia se marcan con BrdU, mostrando su actividad mitótica.

De este modo, pueden observarse células marcadas con BrdU, agrupadas a lo largo de la capa SGZ, e incluso, algunos grupos de estas células se encuentran separadas de las células madre que las han originado tras la mitosis (Encinas et al., 2006). Las células D son positivas para PSA-NCAM (Rao y Shetty, 2004), Doblecortina (DCX) (Encinas y Enikolopov, 2008), la proteína implicada en el crecimiento axonal TUC-4 (de la familia de proteínas “TOAD/Ulip/CRMP”), para el factor de transcripción de la diferenciación neuronal Neuro-D y por último para el gen homeobox Prox -1 que se expresa en las células granulares del DG en el cerebro postnatal (Seri et al., 2004).

- Las células tipo G (Neuronas Granulares)

Estas neuronas se sitúan en el borde entre SGZ-GCL. Su soma es redondeado, con una arborización dendrítica que crece hacia la capa molecular y su axón se prolonga hasta hacer sinapsis con las células de la región CA3 del Cuerno de Amón. Estas células G poseen las características de las neuronas maduras, por tanto raramente se dividen (Kronenberg et al., 2003), eléctricamente activas y capaces de descargar potenciales de acción en respuesta a descargas sinápticas, y de recibir descargas sinápticas tanto inhibitorias como excitatorias. Además son capaces de liberar neurotransmisores en respuesta a los potenciales de acción (Song et al., 2002). Inmunohistoquímicamente este tipo

celular es positivo para marcadores como NeuN, Neuro-D y el gen Prox-1 (“protein-coding prospero homebox-1”).

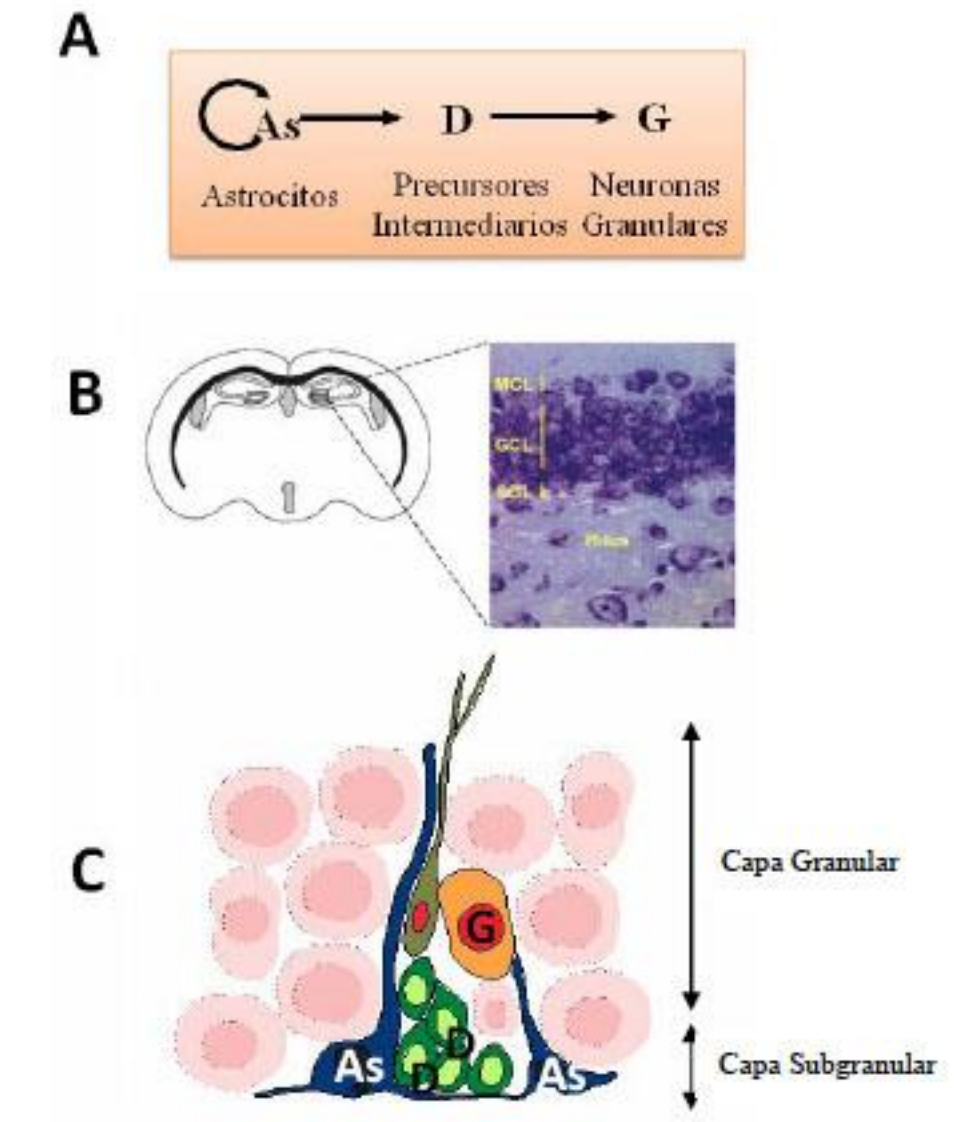


Figura 6. Neurogénesis adulta en la SGZ. (A) Estirpe celular de la SGZ (B) Sección coronal de cerebro de roedor adulto, donde se destaca el Hipocampo y se muestra un ampliación de las capas que pueden observarse en el giro dentado (DG) (C) Ampliación de la capa SGZ del DG, donde se muestra la arquitectura de la SGZ. Las células azules corresponden a las células tipo B o astrocitos (As, B), que al dividirse dan lugar a las células progenitoras D (verdes), que maduran dando lugar a nuevas células granulares G (rojas) (Imagen tomada de Seri et al., 2004).

2.4 PROLIFERACIÓN

En el proceso de neurogénesis pueden diferenciarse varias etapas: la primera sería la proliferación a partir de células progenitoras (citogénesis), en segundo lugar acontece la diferenciación o maduración de las células nacidas a neuronas, proceso que puede ocurrir de forma paralela a su migración, y por último, su integración funcional en circuitos neuronales.

La neurogénesis implica proliferación y diferenciación, que se traduce en la reentrada y salida de neuroblastos en el ciclo celular. En este sentido, existe un incremento en el número de neuroblastos que salen del ciclo celular y se diferencian durante el desarrollo (Caviness et al., 2000). La diferenciación neuronal es un proceso clave, estrechamente vinculada con el ciclo celular, ya que las células que salen de éste en fases tempranas, exhiben unas determinadas características, mientras que las que salen en las fases tardías exhiben otras (Ohnuma y Harris, 2003; Kempermann 2011; Lepousez et al., 2016). Por ello, debe existir una precisa coordinación entre el ciclo celular y la diferenciación neuronal.

En este trabajo se ha utilizado como marcador de proliferación el BrdU (5'-bromo-2-deoxiuridina), para la fase S del ciclo celular. Este marcador exógeno se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA mientras la célula se está dividiendo. Uno de los problemas que muestra este tipo de marcadores

exógenos, es que deben ser inyectados en el animal, y esto puede alterar la división o la diferenciación de las células a estudiar, e incluso, con el uso de drogas la barrera hematoencefálica puede verse alterada y por tanto, la cantidad de dosis que llegaría a las células estaría modificada (Cameron y McKay, 2001; Kee et al., 2002). La sensibilidad del BrdU depende de la dosis inyectada y de la técnica inmunohistoquímica para detectar el anticuerpo (Cameron y McKay, 2001).

Al contrario que con los marcadores endógenos como el Ki-67 o el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), el BrdU identifica a las células en el momento de la inyección, no cuando se obtiene el tejido. Esta diferencia fundamental nos permite marcar las células y analizarlas tiempo después, cuando la célula marcada durante la división ya está diferenciada y madura a neurona. Esta característica ofrece una clara ventaja al experimentador, puesto que puede controlar el momento en el que se efectúe el marcaje de la célula en proliferación y el tiempo que desea prolongar hasta su análisis, en cambio, un marcador endógeno detectable por inmunohistoquímica, únicamente permite visualizar las células que se están dividiendo en el instante del análisis.

Para reforzar los resultados obtenidos con el BrdU, se usan marcadores endógenos, como el Ki-67, encargado de marcar la expresión de esta proteína durante todas las fases del ciclo celular activas: G1 tardía, S, G2 y M, excepto en la fase G0 y la G1 temprana (Kee et al., 2002). Ki-67 es el nombre del clon original del anticuerpo que identifica a la proteína asociada al ciclo celular (mKi67) codificada en ratones en el cromosoma 7. Es una proteína que aparece

de forma esencial durante la progresión del ciclo celular (Starborg et al., 1996; Endl et al., 2001).

2.5 MIGRACIÓN NEURONAL.

La correcta posición de las neuronas es una condición previa para su integración funcional en las tareas neuronales. El bulbo olfatorio es una estructura que continuamente se encuentra con procesos de migración e integración neuronal (Lois et al., 1994). En el DG, las neuronas inmaduras migran una corta distancia desde la capa subgranular a la capa granular (Ming y Song, 2005). Esta incorporación de neuronas en la capa granular se produce durante el desarrollo de manera ordenada, de modo que las células más jóvenes van ocupando regiones más profundas de esta capa.

La incorporación de las células granulares resulta en una estratificación respecto al eje lateromedial, en la que las neuronas más maduras, producidas durante el desarrollo, se sitúan lateralmente en relación a la posición de las neuronas jóvenes (Bayer, 1983).

2.6 REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO

La neurogénesis adulta es un proceso rápido y dinámico (Duman et al., 2001, Kempermann, 2002), que puede ser regulado por factores intrínsecos o por extrínsecos que afectan a la proliferación, supervivencia, maduración e integración funcional de las nuevas neuronas.

La neurogénesis como proceso biológico no es estático, ya que su tasa es variable y es altamente dependiente de los cambios del entorno neuroquímico y ambiental (Peterson, 2002). Estudios recientes han demostrado que la actividad física, los ambientes enriquecidos, la restricción calórica y la modulación de la actividad neural, así como los factores hormonales, los esteroides ováricos y los estrógenos endógenos, actúan como reguladores positivos de la neurogénesis (Van Praag et al., 1999; Banasr et al., 2001; Mirescu y Gould, 2004; Tanapat et al., 2005; Lucassen et al., 2015). Por el contrario, los animales que viven en condiciones de estrés o de aislamiento, presentan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado, e incluso una profunda inhibición (Gould et al., 1997; Tanapat et al., 2001).

La generación de células madre y la diferenciación de las células precursoras son procesos regulados por el microambiente o nicho específico, en el que estas células residen (Álvarez-Buylla y Lim, 2004).

Existen factores que pueden alterar la neurogénesis, entre los que podemos encontrar neurotransmisores y neuromoduladores como el glutamato (Bursztajn et al., 2007, Bai et al., 2003, Parent et al., 1997; Jessberger et al., 2007), dopamina (Höglinger et al., 2004; Malbreg et al., 2000; Van Kampen y Robertson 2004) serotonina (Oleskevich et al., 1991; Duman y Monteggia, 2006), GABA (Freund y Buzsaki, 1996; (Ge et al., 2006); óxido nítrico (Snyder y Ferris, 2000; Packer et al., 2003). Además existen factores tróficos estrechamente relacionados con la neurogénesis e implicados en guiar el destino celular (FGF, EGF, CNTF, IGF,...), pueden determinar el tamaño de una población neuronal o glial (Kuhn et al., 1997; Pencea et al., 2001; Miyamoto et al., 2015). A su vez, estos factores pueden encontrarse en procesos neurodegenerativos sobre-expresados, actuando como protectores, inductores o moduladores de la diferenciación de las nuevas neuronas que sustituirán a las células afectadas (Kuhn et al., 1997; Kuhn et al., 2001; Aberg et al., 2000; Pencea et al., 2001; Winner 2015).

Por otro lado, los astrocitos, además de ser las células madre descritas tanto en la zona de la SVZ como en el DG, juegan un papel muy importante como sensores a los cambios extracelulares del microambiente, y pueden regular la neurogénesis mediante la secreción de señales locales (Song et al., 2002). Estas señales aún son desconocidas, aunque se apunta la posibilidad de que algunas sean flujos iónicos (Berridge, 1995), neuroesteroides (Zwain y Yen, 1999),

neurotransmisores (Scemes, 2000), factores de crecimiento (Spranger et al., 1990) y metabolitos glutamatérgicos (Laming et al., 2000).

Otros compuestos que tienen un efecto directo sobre la regulación de la neurogénesis son los conocidos como compuestos antioxidantes, descritos como cualquier sustancia que presente en bajas concentraciones, retrasa o inhibe la oxidación. Como antioxidantes se incluyen sistemas enzimáticos como las enzimas derivadas del sistema citocromo-oxidasa, las superóxidodismutasas (Cu-ZnSOD y MnSOD), las catalasas y peroxidasas como la glutatión-peroxidasa y la glutatión reductasa.

Así como sistemas no enzimáticos, como las vitaminas A, C, E, Ácido úrico, aminoácidos como, glicina y taurina, y el tripéptido glutatión, etc. que eliminan los radicales libres, evitando la reacción en cadena mediante la cual un radical libre menos reactivo y todavía inestable, reacciona con otra molécula para producir otro radical libre más reactivo.

Estos antioxidantes reaccionan con los radicales libres formados al inicio de la reacción en cadena, de modo que consiguen detenerla. De este modo, este tipo de antioxidantes pueden definirse como aquellas sustancias que ceden electrones a otras, reduciéndolas y haciéndolas menos reactivas, de modo que impiden que progrese la reacción.

A su vez, se han encontrado efectos contradictorios en cuanto a la regulación de la neurogénesis en los nichos clásicos regulada por estrés, en los que una exposición puntual a estrés produce una disminución en la proliferación celular total (Gould et al., 1998), en cambio una exposición más prolongada a bajos niveles de estrés, produce efectos positivos en la neurogénesis (Gould et al., 1997), por último, altos niveles de estrés causan una baja tasa de neurogénesis en el giro dentado o, incluso una inhibición total (Tanapat et al., 2001).

2.6.1 REGULACIÓN POR MUERTE CELULAR

Durante el desarrollo, como durante la neurogénesis adulta, se produce un número de células que excede por mucho el número total de las células finales que serán incorporadas a la estructura. De ellas, las que no son necesarias son eliminadas por apoptosis (Biebl et al., 2000).

Probablemente, el equilibrio entre la neurogénesis y la muerte celular, se deba a la necesidad de recuperar la homeostasis en el cerebro adulto. Esta hipótesis está basada en la observación de que en las zonas neurogénicas, la muerte celular sirva de señal para aumentar la neurogénesis, algunos hechos avalan este argumento:

- a) Durante el desarrollo existe un balance entre las células granulares nacidas y muertas (Gould et al., 1991),

- b) Lesiones mecánicas, aspiración y transección, estimulan la proliferación de precursores neuronales en el SGZ y/o la SVZ, (Gould y Tanapat, 1997, Johansson et al., 1999, Jin et al., 2001, Lang et al., 2004).
- c) La proliferación en la SVZ, se activa tras condiciones de inflamación (Calza et al., 1998),
- d) Adrenalectomías, daños límbicos e isquemias, promueven tanto la muerte celular como la división celular,
- e) La degeneración apoptótica de neuronas corticotalámicas inducen la diferenciación de los precursores neuronales en regiones de la corteza (Magavi et al., 2000).

3 ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES

3.1 ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES EN EL SNC

Las enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central SNC constituyen un amplio espectro de enfermedades inflamatorias idiopáticas en las que intervienen diferentes procesos y factores (genéticos, medioambientales, entre otros) que se caracterizan por provocar un daño en la mielina del SNC.

Su forma de presentación suele ser variable, pudiendo presentarse con un curso crónico, con mayor frecuencia recurrente, o agudo y monofásico. Asimismo, el compromiso del SNC producido por este grupo de patologías puede ser difuso o localizado. Las enfermedades desmielinizantes se clasifican según la forma de presentación y el compromiso focal o difuso del SNC (Tabla 1) (Fernández et al., 2015; Lassmann 2001).

La enfermedad más representativa de este grupo es la Esclerosis múltiple (EM), siendo la enfermedad crónica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y América del Norte, provocando un elevado índice de discapacidad temprana y un alto gasto a los sistemas sanitarios en su tratamiento. La gran heterogeneidad de presentación de esta patología es consecuencia de un complejo grupo de alteraciones inmunológicas e histopatológicas, unido a numerosas influencias genéticas y ambientales (Katz Sand 2015; Polman et al

2011).

CRÓNICAS

Difusas

Por su curso

- EM Recurrente remitente
- EM Primaria Progresiva
- EM Secundaria Progresiva
- EM Progresiva-recurrente

Por su gravedad

- EM Fulminante (Marburg)
- EM Benigna

Localizadas

- Enfermedad de Devic
- Enfermedad de Baló
- Mielopatía transversa

AGUDAS

Difusas

- Encefalomiелitis aguda diseminada (EMAD)
- Leucoencefalitis aguda hemorrágica (LEAH)

Localizadas

- Neuritis óptica
- Mielopatía transversa

Tabla 1: Clasificación de enfermedades desmielinizantes

La evolución clínica de la EM es igualmente diversa, pero la inmensa mayoría de los pacientes pueden ser catalogados en una de las categorías definidas por Lublin y col., forma Recurrente-Remitente (EM-RR) aproximadamente en el 85% de los pacientes, Primaria-Progresiva (EM-PP) en alrededor del 10% y la forma progresiva-recurrente (EM-PR) que es más infrecuente y con pronóstico más grave. Los pacientes con una forma EM-RR al cabo de unos 15 años suelen evolucionar a una forma secundaria progresiva (EM-SP) (Lublin et al 2014).

Como se ha mencionado previamente la manifestación clínica en los pacientes con EM es muy heterogénea, observándose déficits neurológicos focales, agudos y transitorios o crónicos y progresivos, fatiga, alteración cognitiva, temblor, entre otros. La discapacidad y el impacto de estos síntomas en la calidad de vida de los pacientes con EM es uno de los factores determinantes en la búsqueda de tratamientos efectivos que disminuyan la morbilidad y mortalidad de la enfermedad y aumenten la independencia del paciente (McKay et al 2015, Miller et al 2007, Tremlett et al 2009, Koch et al 2009, Planché et al 2015).

La gran heterogeneidad clínica, fisiopatológica y de tratamiento en la EM mencionada en los párrafos previos, ponen en evidencia la necesidad de marcadores biológicos tempranos o modelos experimentales que ayuden a determinar el pronóstico de cada paciente para individualizar y optimizar el tratamiento.

3.2 MODELOS EXPERIMENTALES EN ENFERMEDADES DESMIELINIZANTES

EL desarrollo de modelos experimentales en las enfermedades desmielinizantes se ve dificultado por la complejidad de este grupo de patologías, la heterogeneidad clínica de las mismas como por los distintos aspectos éticos y prácticos que conlleva cualquier enfermedad humana que afecte al SNC, es por ello que la disponibilidad de modelos animales adecuados es de fundamental importancia para avanzar en su conocimiento y desarrollar terapias específicas y efectivas.

Los modelos animales para las enfermedades desmielinizantes incluyen modelos mutantes de mielina, modelos con lesiones inducidas químicamente, modelos virales y autoinmunes. Todos ellos muestran alguna evidencia de desmielinización (Zhang et al 2011; Baker et al 2007; Pachner 2011, Van der Star 2012).

Intentar conseguir un buen modelo experimental para conseguir mimetizar enfermedades desmielinizantes puede ser frustrante, por lo que hay que tener en cuenta varios aspectos. Primero, la etiopatogénesis es desconocida. Los principales modelos se basan en hipótesis pero no hay una clara evidencia de que la EM, por ejemplo, sea debida a un proceso autoinmune o viral, además de que la causa subyacente puede no ser la misma en todos los pacientes. En segundo lugar, algunas de ellas conllevan múltiples efectos en el paciente, pero

los modelos sólo pueden enfocarse en unos pocos aspectos de la enfermedad al mismo tiempo, y ninguno reproduce el espectro entero. Además, el uso ideal de un modelo animal es aportar información sobre los procesos biológicos básicos dentro del SNC, pero existe una presión añadida de la población sanitaria y las agencias de salud para trasladar los resultados obtenidos de los modelos animales a la clínica con una aplicación inmediata.

Asimismo, los distintos modelos se complementan para permitir un mayor abordaje de las distintas problemáticas relacionadas con las enfermedades desmielinizantes. El conocimiento del mecanicismo de los distintos modelos de este grupo de enfermedades permiten una aproximación hacia nuevos diseños de estudio que nos ayuden a seguir avanzando en el conocimiento de estas enfermedades.

3.2.1 MODELOS IN VITRO

La complejidad del SNC, las interacciones entre sus células, así como la interacción inmune-neurológica puede ser simplificada usando cultivos celulares. El fácil acceso y la posibilidad de conseguir cultivos primarios de células del SNC de roedores contrasta con las restricciones de obtención de tejido embrionario humano, en particular neuronas y oligodendrocitos. Por lo que, lo más empleado son líneas celulares y células transformadas genéticamente que son estables y pueden ser sometidas a diversas condiciones experimentales (Van der Star BJ, et al 2012).

Entre los cultivos celulares utilizados encontramos linajes mesodérmicos (microglía y linfocitos) y ectodérmicos (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos). Los cultivos celulares como modelos experimentales in vitro permiten conocer eventos concretos en una amplia cascada de sucesos, lo que favorece el descubrimiento punto a punto de mecanismos, que en su conjunto se puedan visualizar en modelos in vivo.

Otra herramienta utilizada son los cultivos de “rodajas”, las células en los tejidos están influenciadas por las células vecinas y el tejido de la matriz. El contacto íntimo entre las células del SNC se mantiene en cocultivos de células neurales, cultivos de agregados y preparaciones (organotípicas) de “rodajas” de cerebro (Van der Star BJ, et al 2012). Con el uso de cultivos organotípicos de

“rodajas” del SNC se ha conseguido establecer un sistema modelo experimental en el cual la compleja arquitectura del SNC es mantenida y permite la investigación detallada de interacciones entre el SNC y los componentes del sistema inmune, así como los mecanismos del daño y reparación del SNC (Pachner A et al, 2011).

3.2.2 MODELOS IN VIVO

Como se ha comentado anteriormente existen diferentes tipos de modelos in vivo cada uno de los cuales nos permite un acercamiento concreto y nos aporta unas herramientas específicas por lo que debemos saber reconocer qué información veraz podemos extraer de cada uno de ellos

Cabe remarcar que algunas enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple se desarrollan únicamente en humanos lo cuál dificulta aún más el desarrollo de modelos capaces de mimetizar por completo todos los aspectos de esta patología (Pachner A.R., 2011). Así, en todas las aproximaciones el inicio de la enfermedad es artificial y en la mayoría de ellas el periodo transcurrido hasta la aparición de síntomas se reduce con respecto a los observado en humanos (Procaccini et al, 2015) aunque estos modelos son francamente útiles para probar nuevas aproximaciones terapéuticas. En los modelos experimentales in vivo según sus características podemos clasificarlos en tres bloques: un bloque de **modelos autoinmune y/o inflamatorio** de la enfermedad, dentro de los cuales podemos nombrar los modelos de EAE y los virales; y el segundo bloque incluye a los **modelos de desmielinización** que aportan específicamente datos propios de este proceso y donde el punto autoinmune queda de lado, estos modelos incluyen la lesiones químicas por cuprizona, liolecitina, bromuro de etidio, etc. Bajo estos modelos de lesión química resulta interesante evaluar in vivo la respuesta de los nichos

neurogénicos y de las células progenitoras de oligodendrocitos OPCs, siendo esta vía una alternativa terapéutica interesante a modular en la clínica humana, generar más oligodendrocitos y favorecer su recambio y la remielinización. Y por último los **modelos transgénicos o mutantes**, en los cuales se intenta generar un modelo de lesión más similar a la enfermedad, pero que de forma natural nunca existirá.

3.2.2.1 MODELOS DE DESMIELINIZACIÓN POR LESIÓN QUÍMICA

Los agentes más utilizados en estos modelos son cuprizona, lisolecitina (LPC), bromuro de etidio (EB), anticuerpos antiproteínas relacionadas con oligodendrocitos, endotoxinas bacterianas, 6-aminonicotinamida [125] y mezclas del sistema del complemento y anticuerpos antigalactocerebrósido (Van der Star BJ, et al 2012); todos ellos capaces de producir una desmielinización focal tras su administración. Los dos primeros son los más utilizados debido a su capacidad de inducir una desmielinización extensiva en ciertos lugares del SNC como el estriado, el hipocampo, la médula espinal o el nervio óptico entre otros (Van der Star BJ, et al 2012).

3.2.2.1.1 LISOLECITINA

En concreto se sabe que el mecanismo de acción de la lisolecitina se basa en la irrupción en la membrana de mielina causando un daño muy específico. Además, es un agente quimioatrayente para monocitos permitiendo que se desencadene una respuesta inflamatoria pudiendo observarse sus efectos utilizando diferentes animales de experimentación como gatos y conejos además de ratas y ratones (Jeffery and Blakemore et al, 2012). Estos eventos se ven acompañados de una notable astrocitosis. Otra de las grandes ventajas de este

modelo es que el compuesto provoca una supresión de células T permitiendo observar los procesos de desmielinización y remielinización separando los efectos inducidos por la activación del sistema inmune de aquellos debidos al fármaco suministrado (Van der Star, et al, 2012).

II.

JUSTIFICACIÓN

II JUSTIFICACIÓN

Hay evidencia de que al inicio de la EM, existe una remielinización en las lesiones desmielinizadas lo que también se observa en neuroimagen, pero es incompleta y desaparece con el tiempo y ello puede producirse debido a la dificultad de migración y acceso de las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) a las áreas desmielinizadas o que en ellas no se encuentran las condiciones adecuadas para su diferenciación. La posibilidad de que las OPC no sean capaces de madurar en oligodendrocitos (OL), puede ser a que no exista un microambiente que evita la diferenciación de OPC y posterior remielinización de los axones. Todo ello es relevante en el tratamiento de los pacientes con EM, ya que la actual terapéutica solo es efectiva en el control de los mecanismos inmunes y en consecuencia en la fases iniciales de la enfermedad, pero no tienen acción en la remielinización.

Se sabe poco sobre el papel de la VD durante la mielinización, pero hay varios estudios han indicado un potencial papel de la VD en la mielinización y la remielinización. Además, es considerada como un neuroesteroide. La VD tiene función directa sobre la expresión de la sintasa del ácido nítrico inducible en la microglía, esto podría influir en el equilibrio inflamatorio-antiinflamatorio que es relevante en la remielinización. La VD también aumenta la activación microglial lo que podría facilitar la eliminación de los restos de mielina y facilitar la remielinización. Como se ha señalado previamente los OL expresan VDR y la depleción de la VD conduce a una disminución de la diferenciación hacia oligodendrocitos y desmielinización, por ello la VD y VDR son reguladores positivo de la diferenciación de las OPC. La expresión de VDR ha sido descrito

en OPC en cultivo en el tejido de la EM. En las células OPC, VDR heterodimeriza con RXR γ , un factor determinante de la diferenciación OPC que se expresa en las OPCs durante la remielinización. El bloqueo de VDR reduce la diferenciación OPC in vitro y la mielinización y la remielinización, y la activación de VDR a través de VD aumenta la diferenciación. Asimismo, las células madre de origen neural (NSC) expresan VDR y 1,25(OH) $_2$ D. 1,25(OH) $_2$ D incrementa la proliferación de las NSC y su diferenciación a neuronas y oligodendrocitos reduciendo la artrogliosis. Por lo tanto, en el presente trabajo evaluaremos si la administración de VD promueve la proliferación de células NSC, favorece la remielinización y la recuperación de la zona afectada en un modelo de lesión desmielinizante por lisolecitina.

Todo lo anterior permite establecer una hipótesis y más objetivos a alcanzar tras el desarrollo de este trabajo que se describe a continuación.

III.

HIPOTESIS Y

OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La vitamina “D” puede ser considerada como un neuroesteroide y modulador de la inflamación y juega un papel primordial en los eventos remielinizantes y neuroprotectores en el sistema nervioso central

OBJETIVOS

1. Evaluar si la administración de vitamina “D” modula efectivamente la inflamación y la gliosis reactiva en un modelo de lesión desmielinizante por lisolecitina.
2. Evaluar si la vitamina “D” favorece la remielinización y la generación de OPC y la relación de la megalina en este evento.

IV.

MATERIAL Y

METODOS

IV MATERIALES Y MÉTODOS

Para poder demostrar la hipótesis y cumplir los objetivos descritos, se ha seguido el siguiente proceder metodológico.

4.1 ANIMALES

Se utilizaron 24 ratas Wistar macho (Charles River Laboratory) con edad comprendida entre 3 y 4 meses al inicio de los procedimientos experimentales.

Los animales fueron estabulados en jaulas en el animalario del Hospital Clínico San Carlos. Tuvieron acceso a comida (piensos comerciales) y agua *ad libitum*, siguiendo un ciclo de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad, en condiciones de temperatura y humedad adecuadas.

Los animales fueron manipulados en todo momento siguiendo los principios de cuidados de animales de laboratorio publicados por el Comité Ético Español (RD 1201/2005) y las directrices de la Normativa de la Unión Europea (86/609/EEC). El estudio fue aceptado por el Comité de Investigación y el Comité de Ética Animal del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Los animales que recibieron vitamina D (colecaciferón), durante 30 días recibieron un suplemento vía oral de 500UI/kg/día disuelto en 300 microlitros de agua Elix, previamente sonicada y homogenizada la muestra 15 días antes de la inducción del modelo de desmielinización y 15 días más después de la inducción.

4.2 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se establecieron 3 grupos experimentales para el estudio:

- **Grupo 1:** 8 ratas con lesión y sin administración de Lisolectina (Sham ó simulado)
- **Grupo 2:** 8 ratas con lesión y con administración de Lisolectina (lesión)
- **Grupo 3:** - 8 ratas con lesión y con administración de Lisolectina, más la administración colecaciferón (500UI/kg/día) (lesión + VD)

4.3 CIRUGÍA PARA INDUCCIÓN DE LESIÓN DESMIELINIZANTE POR LISOLECITINA

Tras la inducción de anestesia general utilizando una mezcla de fentanilo 0,3mg/kg, medetomidina 0,3mg/kg e intubación orotraqueal con administración de isoflurano 2% para mantenimiento de anestesia, se colocó a cada rata sobre el marco de estereotaxia fijándole la cabeza en tres puntos: ambos conductos auditivos internos y los dientes incisivos. (Figura 7)



Figura 7: Rata situada en marco de estereotaxia fijada en ambos conductos auditivos y dientes incisivos.

Se practicó una incisión longitudinal sobre la calota y se disecó hasta exponer la tabla externa. En primer lugar, se localizaba el punto bregma para mediante coordenadas estereotáficas localizar el ventrículo lateral de la rata. (Figura 8).

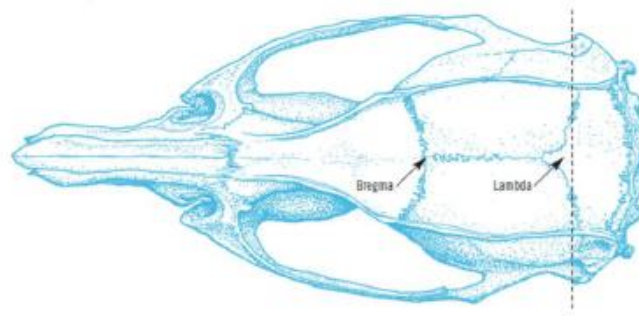


Figura 8: Visión dorsal de la calota de una rata Wistar se muestra la posición de bregma y lambda. Tomado de Paxinos & Watson, 2007.

Basándonos en Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 2007), las coordenadas para el ventrículo lateral desde el punto bregma fueron (-0.5mm anteroposterior, -1,4 mm lateral y 3 mm dorsoventral. (Figura 9).

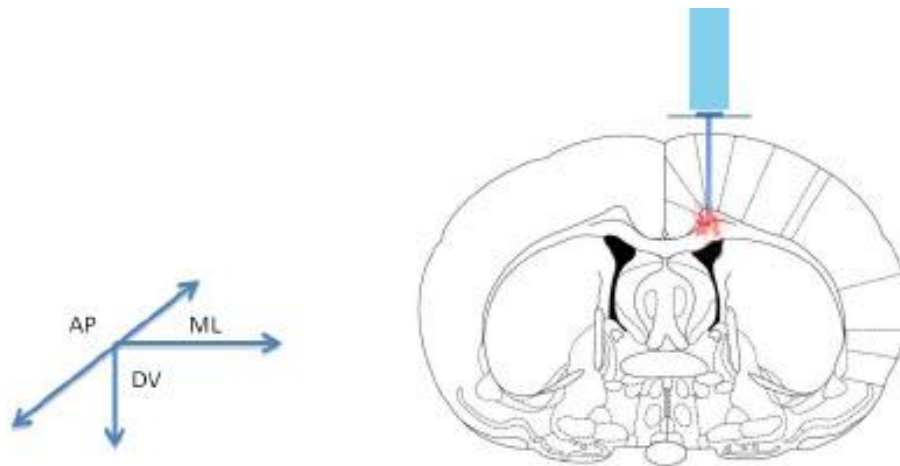


Figura 9: Representación esquemática de las coordenadas de estereotaxia para la inyección en el cuerpo calloso (Tomado de Paxinos & Watson, 2007)

Con un taladro de diamante, se realizó un agujero de trépano de aproximadamente 1,5mm de diámetro. Una vez realizado el trépano y colocada en las coordenadas la jeringa se procedió a realizar la infusión de 10 microlitros

de una solución de Liolecitina 1% (Lysophosphatidylchoine, Sigma L1381), disuelto en salino fisiológico. Una vez realizada la inyección se procedió a cerrar la herida colocando celulosa para generar hemostasia y posteriormente se procedió a suturar la piel en monoplano con seda 2-0 en puntos discontinuos.

Además, todos los animales (lesionados y no lesionados) al momento de la cirugía recibieron una inyección intraperitoneal de 5-Bromo-2-deoxiuridina (Sigma B9285) disuelta en solución salina a una dosis de 50 mg/kg de peso, para marcar las nuevas células proliferantes.

4.4. VARIABLES CLÍNICAS EXPLORADAS

Los animales se pesaron cada semana en una balanza digital. Transcurrida una semana desde la intervención quirúrgica, se exploró a los animales cada tercer día, evaluando la función motora de las ratas mediante el test del plano inclinado. Para mantener el ciego, durante la exploración se desconocía a qué grupo experimental pertenecía la rata.

- Plano inclinado

Aunque este test fue desarrollado para la evaluar la función motora de un modelo de lesión de médula espinal, resulta interesante su análisis por la vecindad a la zona cortical motora primaria. La rata se coloca lateralmente, perpendicular al eje mayor del plano inclinado, y se mide el ángulo máximo en el que pueden mantener su posición sin caerse durante 5 segundos (Figuras 10). Para evaluar la fuerza de las 4 extremidades de igual forma, en primer lugar se coloca al animal con las extremidades derechas hacia abajo, y después con las extremidades izquierdas hacia abajo (Rivlin, 1977). Una puntuación menor de 70° se correlacionaba con el inicio de la debilidad muscular (Matsumoto, 2006).



Figura 9: Imagen que muestra la evaluación de una de las ratas en el plano inclinado

4.5 SACRIFICIO DEL ANIMAL

Los animales eran profundamente anestesiados mediante una inyección intraperitoneal con una dosis de pentobarbital de 60mg/kg y fentanilo 0,3mg/kg como analgesia. Se proseguía con el sacrificio y fijación de estructuras del animal mediante perfusión transcardiaca. Para ello se realizó una toracotomía con colocación del catéter en el ventrículo izquierdo, y se administraba suero salino fisiológico al 0,9%, de esta manera se arrastra la sangre del lecho vascular. Una vez que el flujo que sale por la aurícula derecha tiene aspecto transparente, se comienza con la solución fijadora, en este caso una mezcla de paraformaldehído al 4% y tampón fosfato 0,1 M. (Fig 11).



Figura 11: Imagen que muestra la técnica de perfusión transcardiaca para fijación de estructuras.

Una vez fijado, se extrajeron los cerebros y médulas espinales de los animales, se lavaron con tampón fosfato 0,1M y se crioprotegieron mediante

inmersión en sacarosa 30% y en medio OCT (*Optimal Cutting Temperature*). El material se conservó a -80°C hasta su uso.

El sacrificio del animal se realizó siguiendo los principios de cuidados de animales de laboratorio publicados por el Comité Ético Español (RD 1201/2005) y las directrices de la Normativa de la Unión Europea (86/609/EEC).

4.6. PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

Se realizaron secciones coronales de 40 μm de grosor de la zona comprendida entre las coordenadas de 1,5 a -1,5 de bregma que contenía la lesión desmielinizante en el cuerpo calloso y la corteza motora. Para ello se utilizó un criostato (Microm) y se colocaron las secciones en una solución de criopreservación para tejido cerebral compuesta de etilenglicol y dimetil sulfóxido.

4.6.1. TÉCNICAS DE INMUNOFLUORESCENCIA

Para las técnicas de inmunofluorescencia en primer lugar se lavaron las secciones con tampón PBS, se permeabilizaron con Triton x-100 al 0,1% en PBS 0,1M y se bloquearon con suero de cabra al 10% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente para evitar las uniones inespecíficas. Sólo los tejidos en donde se analizó la expresión de BrdU se les realizó un tratamiento previo con 2N de HCl por 20 min. A continuación, se incubaron los cortes con el anticuerpo primario correspondiente durante toda una noche a una temperatura de 4°C. (Tabla 2).

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las secciones se lavaron con PBS tres veces para eliminar el exceso de anticuerpo primario restante y

después se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario específico para cada anticuerpo primario (ratón, rata, conejo o cabra), acoplado a fluoróforos como Cy3-(1:1000, Jackson) o Alexa Flúor 488, 555 o 647 (1:500, Invitrogen). Todos los anticuerpos se diluyeron con PBS.

Las secciones fueron lavadas en PBS tres veces, y se contratiñeron con DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol 1 µg/ml, Sigma-Aldrich), un marcador de los núcleos celulares en dilución 1:5000 durante 10 min. Fueron montados sobre portas gelatinizados y se cubrieron con el medio de montaje acuoso FluorSave (Calbiochem) adecuado para la fluorescencia. Se realizaron tres réplicas por marcador.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Dilución / Casa Comercial / Cat	Descripción
Anti-IBA-1	1:1000, Wako, 019-19741	Proteína de unión a calcio que se expresa de forma específica en células de microglía y que está sobreexpresada durante la activación de estas células.
Anti-GFAP	1:600, Millipore, MAB360	Proteína ácida gliofibrilar, proteína de los filamentos intermedios de astrocitos, su expresión aumenta con la activación astrocitaria
Anti-Caspasa 3	1:200, Millipore, 04-1090	Caspasa efectora de la apoptosis, común a las vías extrínseca e intrínseca.
Anti-DCX	1:200, Santa Cruz, SC 8066	Marcador de neuroblastos
Anti-MBP	1:500, Abcam AB65988	Proteína básica de la mielina
Anti-Olig2	1:300, Abcam AB81093	Marcador de oligodendrocitos inmaduros
Anti-BrdU	1:200, Abcam 6326	Análogo de la timidina y marcador de células madre proliferantes
Anti-LRP2	1:200, Abcam 184676	Receptor de la megalina
Anti-NeuN	1:500, Millipore MAB377	Marcador de neuronas

4.5.2 ANÁLISIS Y CUANTIFICACIÓN DE LA INMUNOFLUORESCENCIA

La cuantificación de las técnicas inmunohistoquímicas se realizó en ciego en todos los casos estudiados, con un microscopio confocal Olympus AF1000, contando entre 6-8 secciones seriadas del hipocampo del animal. Las células positivas de cada marcador por sección fueron sumadas y se obtuvieron las medias para cada uno de ellos.

En los experimentos con el marcador BrdU, las células positivas se dividieron en dos grupos, las células situadas en la SVZ y las que se encontraban en la zona de lesión.

Para el análisis de la microglía se utilizó el marcador IBA-1. La determinación del grado de activación de la microglía se realizó dibujando 100 células con la cámara clara (Fig. 12), midiendo la expansión del árbol dendrítico con una plantilla de aros concéntricos separados cada 5 μm . De manera que, se contó las veces que la dendrita era cruzada por una aro concéntrico, para evaluarse la media de cruces del total de neuronas dibujadas por animal.

Posteriormente se clasificó en categorías de activación todas las microglías dibujadas, para comparar las categorías obtenidas en animales tratados y controles. El mismo método fue publicado por González-Pérez y colaboradores, y ha sido empleado en otros trabajos (González-Pérez *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2009). Se siguió la escala de categorías de activación de la microglía descrita en la figura siguiente para la clasificación.

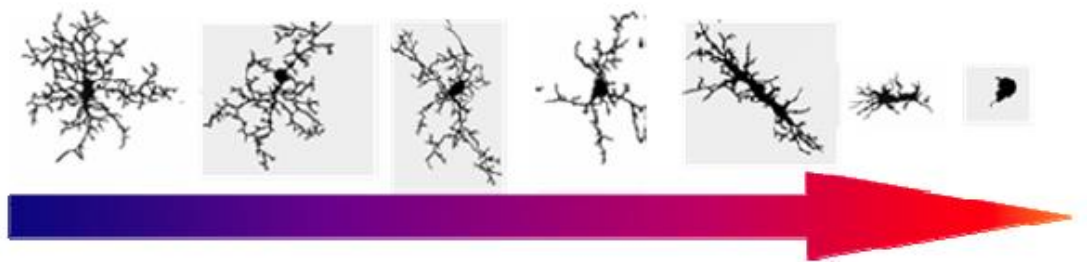


Figura 12: Análisis de la transformación microglial. Se clasificaron las células de microglía según su nivel de activación. De este modo se observa que las células menos activas son aquellas que poseen una mayor extensión del árbol dendrítico, y las más activas son las de tamaño más reducido, sin apenas árbol dendrítico aparente, puesto que se ve compactado en el soma. La flecha de debajo de las células dibujadas indica el sentido de activación de la microglía, indicando el azul una menor activación y el color rojo la activación máxima.

Para los marcadores se obtuvieron imágenes de microscopía confocal mediante el programa Olympus Confocal (Olympus Fluo View FV1000) utilizando los objetivos de aceite de inmersión 20x o 40x. Se utilizó el láser adecuado para cada una de las ondas de excitación de los fluorocromos utilizados (Alexa Fluor 488, 555, 647, Cy3 y diodo azul para el DAPI). La inmunorreactividad de los anticuerpos utilizados se cuantificó mediante el uso del programa de análisis ImageJ versión 1.42q (USA). El número de células inmunorreactivas se estableció mediante el conteo de células positivas en un área de 368 μm^2 escogida al azar de cada sección, utilizando tres o cuatro secciones diferentes de cada una de las zonas estudiadas (corteza motora, cuerpo calloso y SVZ). Todas las imágenes se obtuvieron mediante un método secuencial, con la finalidad de evitar en lo posible cualquier tipo de señal cruzada entre los canales.

Se llevó a cabo el análisis mediante medidas de densidad óptica (proceso de imagen binaria de blanco y negro), obteniendo el porcentaje de células positivas por campo analizado. Se seleccionaron al azar 8 áreas por cada animal. Para este procedimiento se utilizó el programa ImageJ versión 1.42 (USA).

4.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de conteos inmunohistoquímicos y las pruebas clínicas se analizaron mediante el test de ANOVA, seguida de una prueba post-Hoc de Tukey en todos estos casos se empleó el programa “Statview 5.0”. Además, se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism, En todas las gráficas se muestra la media de cada grupo junto con el error estándar (SEM) para el ajuste de las barras de errores.

V.

RESULTADOS

V RESULTADOS

5.1 VARIABLES CLÍNICAS EXPLORADAS

Como consecuencia de la intervención quirúrgica no se observaron decesos en ninguno de los grupos y hasta el momento del sacrificio no mostraron datos de infección en la zona quirúrgica, tampoco presentaron crisis epilépticas ni ninguna otra complicación. El tratamiento con vitamina D fue bien tolerado y no se mostró ninguna alteración atribuible a sobredosis o intoxicación tales como: hemorragias, esteatorrea o alteraciones pondentales.

Resultados de las evaluaciones en el plano inclinado a lo largo del tiempo de observación desde la implantación de la bomba osmótica. Se expresa la media de cada grupo en cada semana de evaluación. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En cuanto a las variables clínicas, peso y plano inclinado, se encontraron diferencias significativas en las variaciones de peso de las ratas desde el procedimiento quirúrgico hasta el momento de sacrificio entre los grupos Sham, LLC+VD y LLC (Fig. 13) (* $P < 0.05$). Además, la puntuación en el plano inclinado presentó variaciones significativas una semana después de la cirugía, manteniéndose entre un mínimo de 60° de inclinación y un máximo de 70° en los tres grupos experimentales (Fig. 14) (* $P < 0.05$).

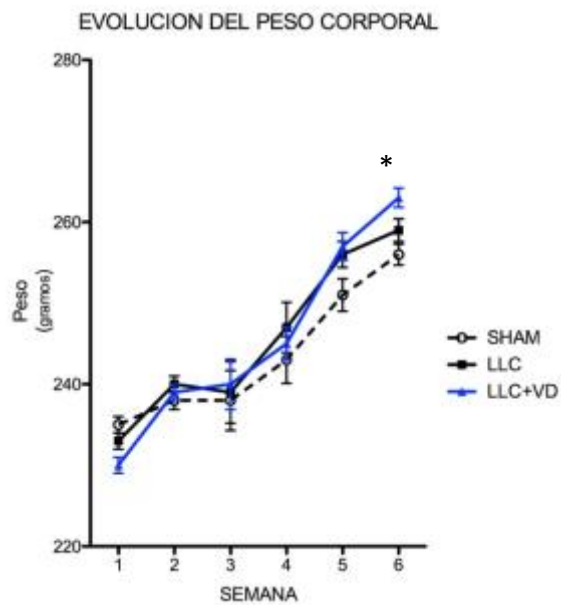


Figura 13: Peso corporal. En el grupo con LLC se observaron diferencias con los otros dos grupos de animales a partir de la 4 semana y hasta el momento del sacrificio. El grafico muestra la media \pm error estandar.

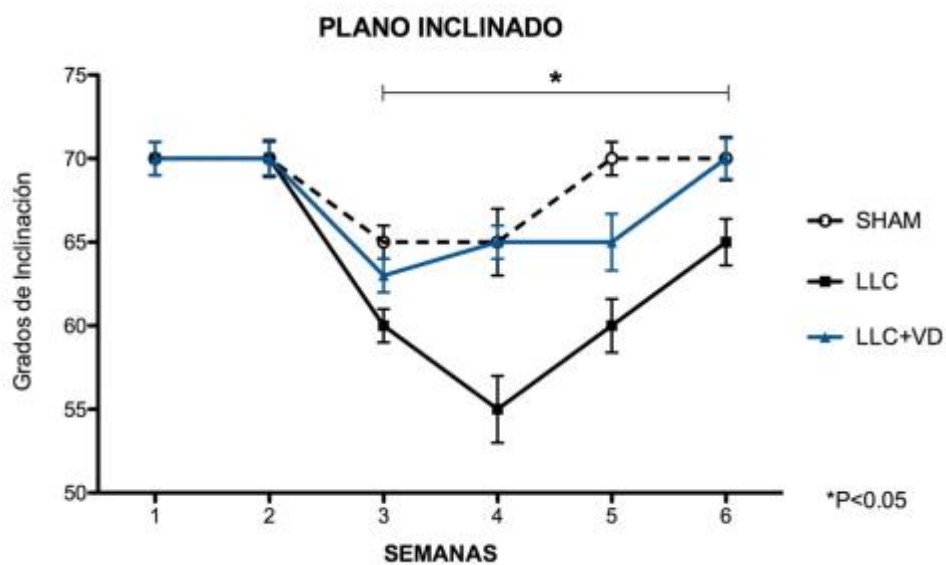


Figura 14: Plano Inclinado . A partir de la tercera semana coincidente con la cirugía se observaron diferencias estadísticas entre el grupo LLC y los otros dos. Siendo estadísticamente significativa. El grafico muestra la media \pm error estandar.

Al verificar mediante técnicas de inmunohistoquímica, si la lesión se encontraba generada en las coordenadas establecidas, encontramos que en todos los animales existió lesión en la zona esperada, además de una marcada disminución de la expresión la proteína básica de la mielina, dato analizado y cuantificado en densidades ópticas (Sham: 1103 ± 74.91 ; LLC: 548.2 ± 90.58 ; LLC+VD: $913.4 \pm 96.95.1$) (Fig. 17) siendo este dato estadísticamente significativo (Sham vs LCC: 0.0025; Sham vs LCC+VD: 0.01) (Fig 15).

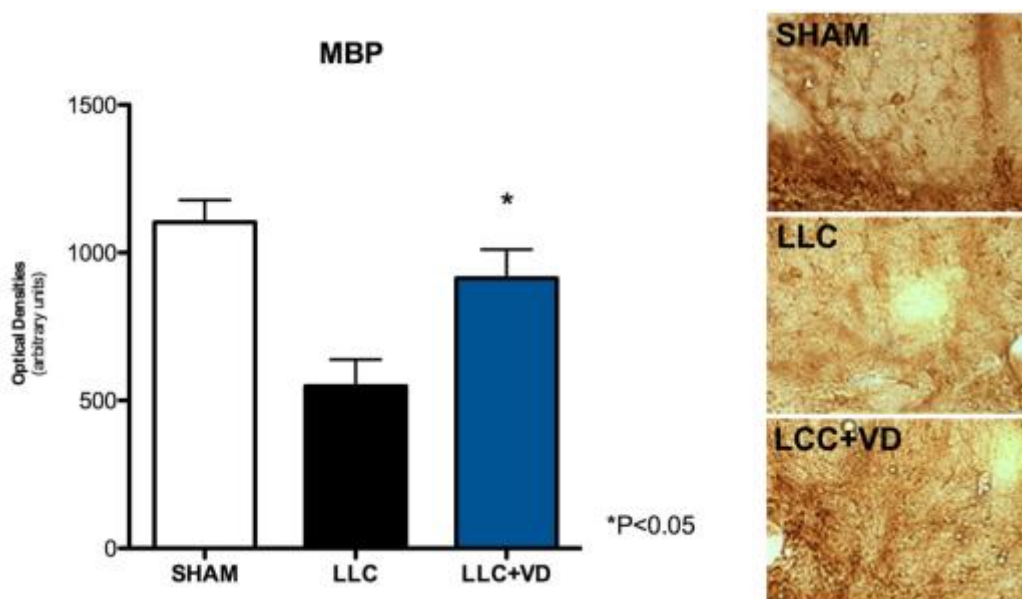


Figura 15. Grafico y fotomicrografías de las lesiones ocasionadas en el sham y en los grupos con LLC. En el analisis de la lesión se muestra que al cuantificar la MBP existe una reduccion en la mielina precente en la zona perilesional. Imágenes tomadas a 20X. El grafico muestra la media \pm error estandar.

5.2 ZONA SUBVENTRICULAR

Debido a las características de la lesión y su cercanía con la SVZ, considerada como nicho clásico de la neurogénesis adulta, resulta interesante conocer la activación de la proliferación y la diferenciación observada a el tiempo de sacrificio.

5.2.1 PROLIFERACIÓN CELULAR

En el presente experimento, en todos los animales 15 días antes de realizar el abordaje quirúrgico se les inyectó BrdU tanto a los animales control como a los tratados, y cuatro semanas después fueron sacrificados por perfusión intracardiaca. Los resultados observados, prácticamente, no mostraron variaciones en las medias de las células marcadas con BrdU, entre el grupo de animales LLC (92 ± 3.5 células BrdU+), con respecto a los animales control (81.25 ± 2.496 células BrdU+), pero sí se evidenció un marcado incremento de células en los animales del grupo de LLC-VD(103.5 ± 2.91 células BrdU+), siendo este significativamente estadístico ($P=0.0019$) (Fig.16).

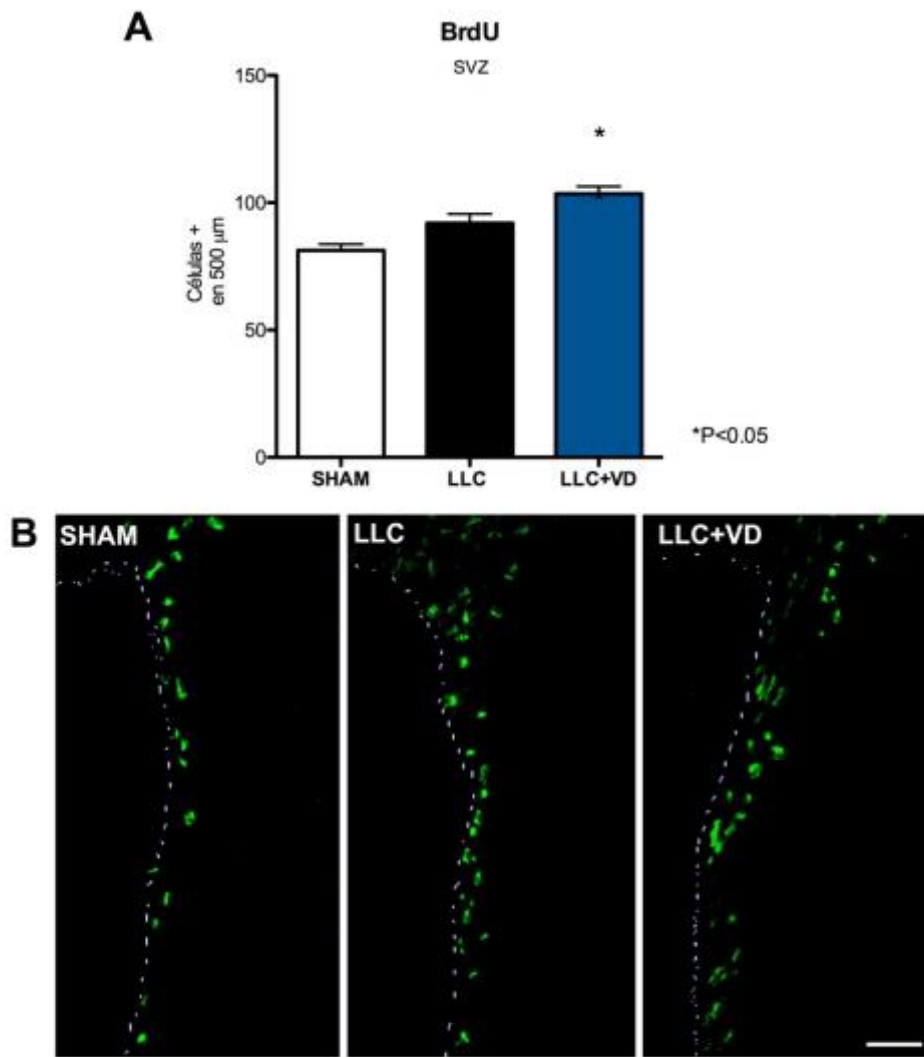


Figura 16: Proliferación celular en la SVZ . A) Los graficos muestran la captación de BrdU, que es un analago de la timidina, donde se muestra que el grupo donde se administro VD hay un incremento de el numero de celulas BrdU positivas. Siendo estadsticamente significativa. El grafico muestra la media \pm error estandar. B) imágenes representativas de la expresion de BrdU en la SVZ. Escala: 100 micras

5.2.2. DIFERENCIACIÓN CELULAR EN LA SVZ

En el análisis de la diferenciación celular de la SVZ no existieron diferencias significativas en la cuantificación de la expresión de células GFAP+ que colocalizaban con BrdU, solo el grupo SHAM mostro un ligero incremento en la población astrocitaria (Sham: 31.75 ± 6.87 ; LLC: 28.75 ± 3.224 ; LLC+VD: 25.5 ± 2.1) (Fig 17 A y B).

En cambio sí fue evidente un incremento de las células positivas al marcador DCX y BrdU; el marcador DCX es típicamente utilizado para identificar a los neuroblastos, encontrado un incremento de estas células en el grupo que recibió VD, mostrando hasta dos o tres capas de células en la vecindad de la pared ventricular, cuando lo normal es considerado una capa de células DCX+ (Sham: 49.5 ± 6.98 ; LLC: 63.25 ± 3.425 ; LLC+VD: 78 ± 4.7) (Fig 17 A y C), considerándose estos valores significativamente estadísticos (*P=0.01).

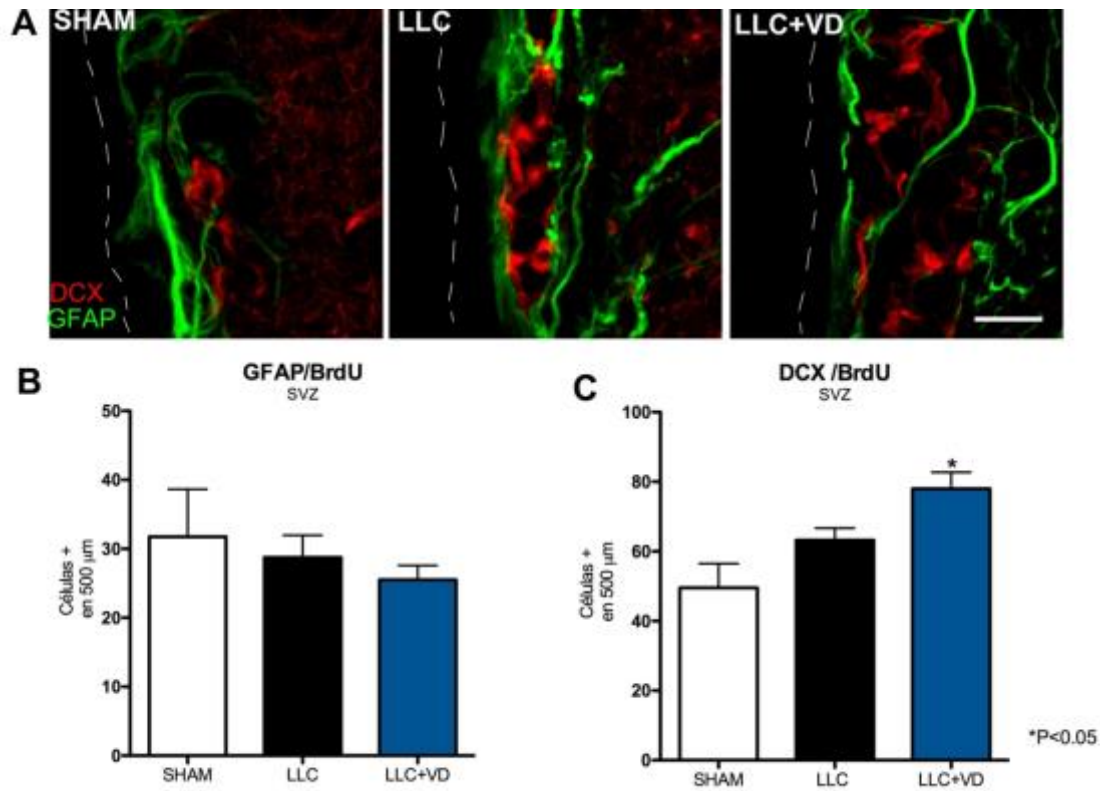


Figura 17: Diferenciación celular en la SVZ . A) Imágenes representativas de la expresión de GFAP y DCX en la SVZ, donde es evidente la formación de gliotubos GFAP+ que acompañan a las cadenas de células migratorias. B y C) Los gráficos muestran la captación de GFAP / BrdU y DCX/BrdU, C) Se muestra que el grupo donde se administró VD hay un incremento de el número de células DCX/BrdU positivas. Siendo estadísticamente significativa. El gráfico muestra la media \pm error estándar. Escala: 20 micras

5.3 ZONA DE LESIÓN

La lesión, ya sea en el grupo Sham por la aguja o en los otros dos grupos experimentales por el insulto químico realizado genera un microambiente proliferativo, ya que el cuerpo calloso, lugar de la lesión, es considerado como un nicho neurogénico en la vida adulta donde las células procedentes de la SVZ migran y se mantienen quiescentes hasta recibir el estímulo que active su proliferación (González-Pérez O. et al 2012), además este tipo de insultos químicos desencadenan una respuesta inflamatoria mediada por las células microgliales.

5.3.1. PROLIFERACIÓN CELULAR EN LESIÓN

En el borde de la lesión, se encontraron células positivas para el marcador BrdU, que posiblemente migraran cortas distancias desde el mismo cuerpo calloso o de la SVZ, las células positivas a BrdU se encontraban dispersas y sin formar grupos, además el grupo que recibió VD mostro un incremento significativo (Sham: 16.75 ± 1.14 ; LLC: 16.13 ± 1.06 ; LLC+VD: 22 ± 0.91) ($P=0.0002$).

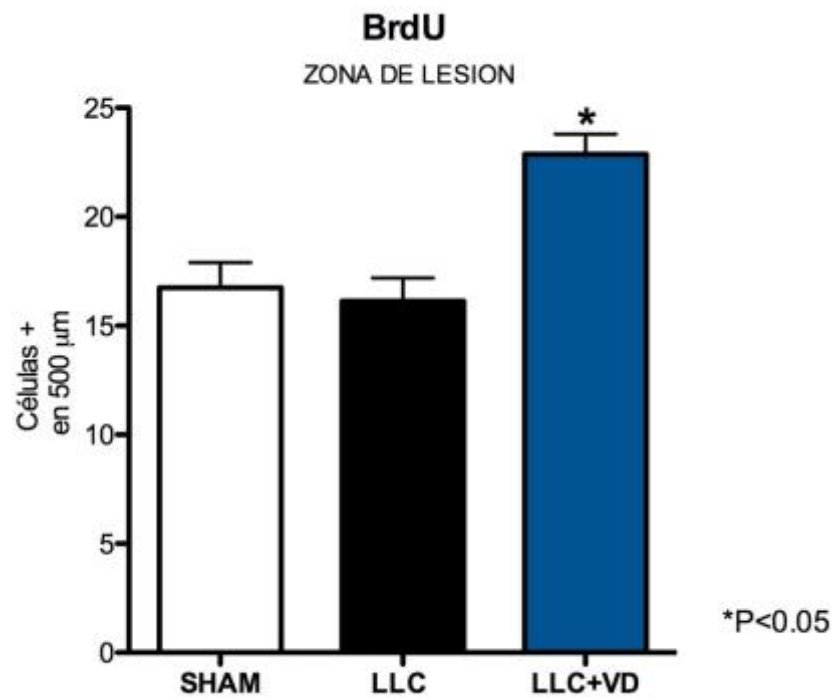


Figura 18: Proliferación en la zona de lesión, se muestra un marcado incremento de células BrdU + en la zona de lesión del grupo LLC+VD en comparación a los otros grupos de trabajo. Siendo estadísticamente significativa. El gráfico muestra la media \pm error estándar.

5.3.2. DIFERENCIACIÓN EN LESIÓN

El gráfico anterior (Fig. 17) muestra un marcado incremento de las células BrdU en la zona de lesión y en el grupo donde se administró VD, por lo que resulta interesante evaluar qué marcador coexpresan las células BrdU encontradas en la zona de lesión.

Al analizar la coexpresión de BrdU y GFAP resultó evidente un ligero incremento en el grupo de animales que se les administró VD (Sham: 14.38 ± 0.94 ; LLC: 13.53 ± 0.84 ; LLC+VD: 17 ± 1.01), siendo este dato estadístico ($P=0.02$) (Fig 19 A). y al analizar el número de neuroblastos que migraron a la zona de lesión también observamos un incremento significativo en el grupo tratado con VD (Sham: 2.38 ± 0.284 ; LLC: 2.55 ± 0.33 ; LLC+VD: 5.66 ± 0.47) ($P=0.001$) (Fig 19 B). Por último, al evaluar si existían células inmaduras de oligodendrocitos en la vecindad de la lesión encontramos de nueva cuenta un incremento de este tipo celular que inclusive era el doble que lo encontrado en los otros dos grupos de trabajo (Sham: 2 ± 0.21 ; LLC: 2 ± 0.81 ; LLC+VD: 5 ± 0.71), siendo este dato estadístico ($P=0.002$) (Fig 19 C). Esta última observación es importante ya que muestra que la vitamina D, bajo las condiciones de este estudio, incrementa la proliferación a estirpe oligodendroglial.

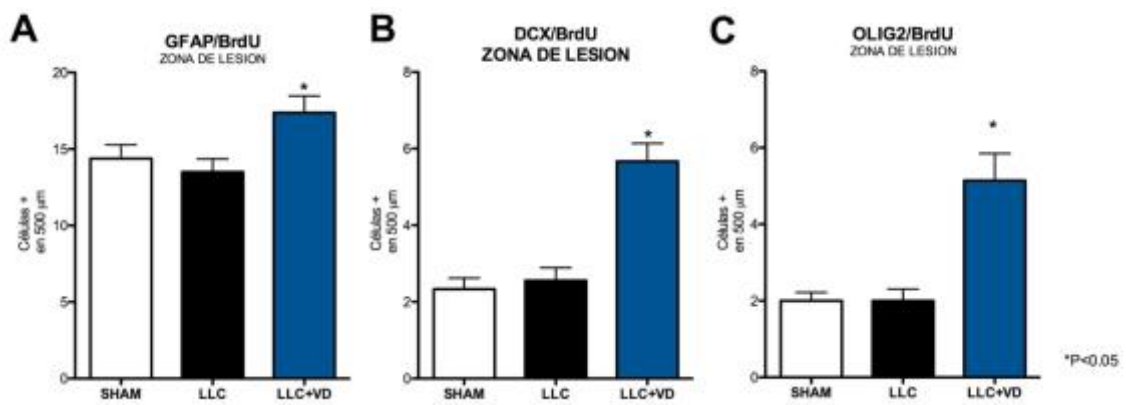


Figura 19: Diferenciación en la zona de lesión. Se muestra un marcado incremento de células BrdU + y colocalizando con GFAP, DCX y Olig2, en la zona de lesión del grupo LLC+VD en comparación a los otros grupos de trabajo. Siendo estadísticamente significativa. El gráfico muestra la media \pm error estándar.

5.4 RESPUESTA MICROGLIAL

Las células microgliales (identificadas en este caso como IBA1+) juegan un papel fundamental en procesos de inflamación, remodelación y hemostasia de la zona lesionada, además de actuar activamente como células limpiadoras de debris en las zonas que posteriormente serán regeneradas endógenamente. Es importante no solo evaluar el numero celular si no también su forma, ya que el estado de activación que puedan mostrar dependerá si esta arborizada (quiescente) o activada (ameboidea) (Fig,12).

En el presente estudio se observó un incremento significativo de células microgliales en el grupo de LLC en comparación a los otros dos grupos de animales (Sham: 28 ± 2.81 ; LLC: 34.75 ± 1.91 ; LLC+VD: 22 ± 1.61), siendo este dato estadístico ($P=0.002$) (Fig 20). Además en el análisis morfológico a través del método de cuantificación de las intersecciones de círculos concéntricos, el grupo LLC mostro una fenotipo ameboide y el grupo sham y LLC+VD mostraron células ameboides pero también células arborizadas que recordaban a microglías quiescentes. Este dato apoya muestra efectos de regulación sobre la inflamación de la vitamina D ya descritos por otros autores.

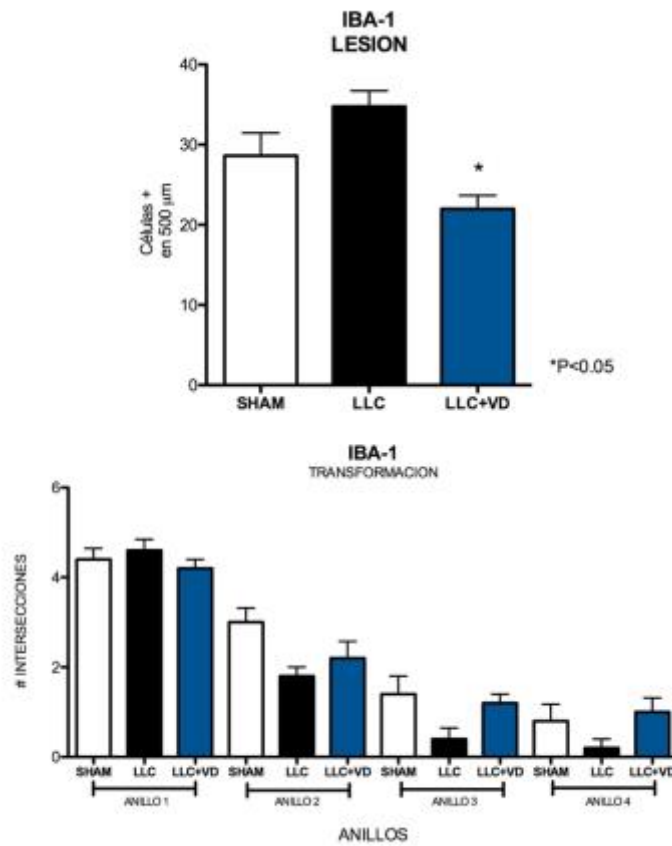


Figura 20: Los gráficos muestran el número de células microgliales en la zona de lesión y su fenotipo, analizado a través del método de anillos concéntricos. El gráfico muestra la media \pm error estándar.

5.5 EFECTOS NEUROPROTECTORES DE LA VITAMINA D

Con los datos anteriormente descritos, tanto en proliferación, diferenciación y activación microglial en la SVZ y zona de lesión, resulta interesante evaluar si la administración de VD modula o reduce la apoptosis celular en la vecindad de la lesión, para ello analizamos la coexpresión de NeuN, marcador clásico de neuronas y caspasa 3 –marcador de la vía extrínseca de la apoptosis celular. Encontramos que la administración de VD reduce el número de neuronas en proceso de apoptosis, pero solo marcando una tendencia a la baja sin llegar a ser significativamente estadística contra el grupo Sham (Sham: 17.25 ± 1.8 ; LLC: 33.50 ± 5.17 ; LLC+VD: 24.5 ± 1.51), pero , el grupo sham si mostro diferencia estadística con el LLC ($P=0.002$) (Fig 21).

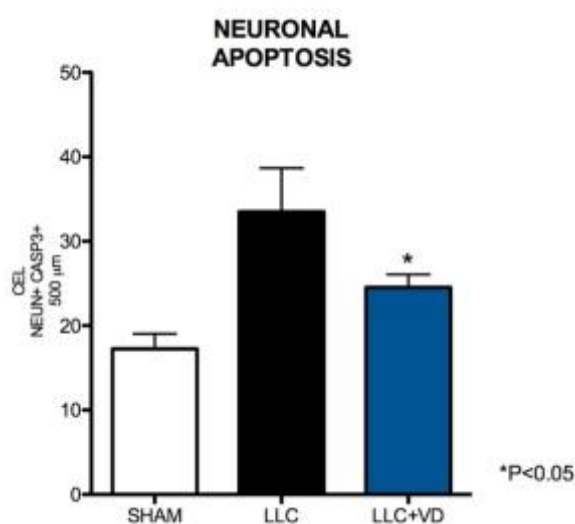


Figura 21: Los gráficos muestran el número de neuronas en la zona de lesión que coexpresan caspasa 3. El gráfico muestra la media \pm error estandar.

5.6 EXPRESIÓN DE MEGALINA EN LAS CÉLULAS EN LA ZONA DE LESIÓN

Ya mencionamos los efectos de la administración de VD en un modelo de lesión desmielinizante por lisolecitina, resulta interesante evaluar si con estas condiciones experimentales existía una diferencia en la expresión del receptor LRP2 (megalina) en las células, oligodendrogliales jóvenes (Olig2), astrocitos (GFAP), Neuroblastos (DCX) y en neuronas corticales (NeuN).

Los resultados nos muestran que no existen diferencias estadísticas en la expresión del receptor en ninguno de las estirpes celulares analizadas. Aunque está descrito que el RVD tiene funciones directas sobre su metabolismo y función de la vitamina D (Matias-Guiu J. et al 2016) no es posible con lo establecido metodológicamente en este trabajo ver o confirmar este punto. Por lo que se requieren trabajos posteriores para analizar en profundidad el comportamiento de la vitamina D en este modelo de lesión.

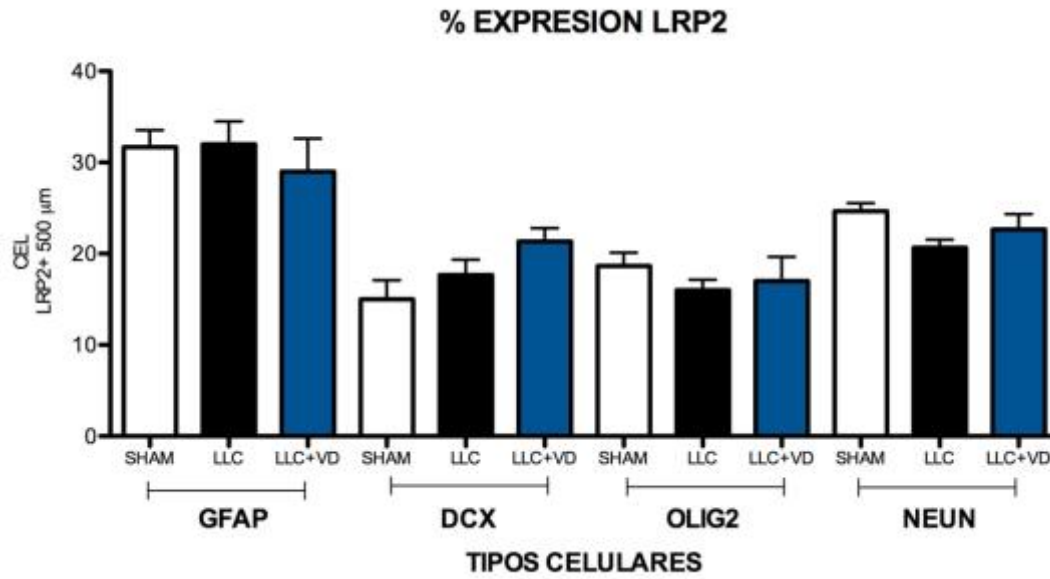


Figura 22: Los gráficos muestran la coexpresión de los receptores (LRP2) para megalina en las células de la zona de lesión. No se encontraron diferencias en la expresión del receptor entre los grupos ninguna de las células analizadas. El gráfico muestra la media \pm error estándar.

VI.

DISCUSSION

VI DISCUSION

El impacto biológico, social, económico y psicológico de las patologías desmielinizantes a nivel mundial es de gran importancia por su alta tasa de discapacidad y coste al sistema sanitario. Esto ha motivado la búsqueda de diversos enfoques experimentales encaminados a disminuir la magnitud del daño o prevenir la enfermedad. Pese al gran abanico de conocimientos existentes en los últimos años sobre este tipo de patologías, el impacto real ha sido verdaderamente muy limitado, lo que es directamente reflejado en la alta morbilidad y mortalidad de este tipo de patologías.

Es tal la cantidad de sustancias novedosas y tratamientos experimentales en proceso de estudio que su enumeración y clasificaciones resulta complicada. El presente trabajo pretende recuperar y ampliar lo conocido sobre la vitamina D en la proliferación de la zona subventricular en el cerebro adulto, al ser considerado un neuroesteroide que posee no solo efectos en órganos clásicos, sino también en el cerebro, específicamente en las células madre de los nichos neurogénicos clásicos del sistema nervioso central y en neuronas y células gliales.

PROLIFERACIÓN Y DIFERENCIACIÓN EN LA SVZ Y ZONA DE LESIÓN

En este trabajo se ha utilizado como marcador de proliferación el BrdU (5'-bromo-2-deoxiuridina), para la fase S del ciclo celular. Este marcador exógeno se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA mientras la célula se está dividiendo. Uno de los problemas que muestra este tipo de marcadores exógenos, es que deben ser inyectados en el animal, y esto puede alterar la división o la diferenciación de las células a estudiar, e incluso, con el uso de drogas la barrera hematoencefálica puede verse alterada y por tanto, la cantidad de dosis que llegaría a las células estaría modificada (Cameron y McKay, 2001; Kee et al., 2002). La sensibilidad del BrdU depende de la dosis inyectada y de la técnica inmunohistoquímica para detectar el anticuerpo (Cameron y McKay, 2001).

Al contrario que con los marcadores endógenos como el Ki-67 o el antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA), el BrdU identifica a las células en el momento de la inyección, no cuando se obtiene el tejido. Esta diferencia fundamental nos permite marcar las células y analizarlas tiempo después, cuando la célula marcada durante la división ya está diferenciada y madura a neurona. Esta característica ofrece una clara ventaja al experimentador, puesto que puede controlar el momento en el que se efectúe el marcaje de la célula en proliferación y el tiempo que desea prolongar hasta su análisis, en cambio, un marcador endógeno detectable por inmunohistoquímica, únicamente permite visualizar las células que se están dividiendo en el instante del análisis.

En la presente investigación se ha establecido un esquema de administración del marcador exógeno BrdU, con la intención de analizar si existía un efecto de la vitamina D sobre la proliferación celular bajo un modelo de lesión desmielinizante.

Así, se encontraron efectos sobre la proliferación tras una administración de VD durante 30 días, encontrando un marcado incremento sobre la proliferación celular en el grupo el que se administró la VD. Por tanto, puede decirse que la VD afecta a la proliferación celular en cerebros de animales adultos; este evento no solo fue visualizado en la SVZ, nicho clásico neurogénico, si no también en la periferia de la zona de lesión, la que se encontraba en el cuerpo calloso. Se ha descrito que la SVZ es la responsable de la generación de oligodendrocitos en la vida adulta, y que células OPC migran desde la SVZ al cuerpo calloso y ahí se mantienen quiescentes (Gonzalez Perez et al 2012) . Por lo que podemos decir que la VD tuvo efectos directos sobre la proliferación en ambas zonas y además promovió la diferenciación a estirpe oligodendroglial, al observarse mayor cantidad de células Olig2/BrdU + , evento fundamental para reestablecer la mielinización en este modelo. Otro punto importante fue el incremento de astrocitos de nueva generación, los que intervienen directamente en la generación de un microambiente propicio para promover o inhibir la regeneración. Por último, resulta de sumo interés que la VD favorezca el incremento de neuroblastos en la vecindad de la lesión al ver un incremento de dos veces de las células DCX/BrdU en esta zona. Lo que puede

ser considerado como una respuesta de recambio neuronal endógeno de las células afectadas.

6.2 MODULACIÓN DE LA ACTIVIDAD MICROGLIAL

Cuando el sistema nervioso es sometido a un estímulo natural fisiológico o patológico las células microgliales se activan y se transforman en macrófagos (Kreutzberg, 1995). El proceso de activación transformación es caracterizado por una proliferación de la estirpe microglial, aumento de la expresión de moléculas propias de este tipo celular (como el número de antígenos del complejo de histocompatibilidad (MHC) (Kreutzberg, 1995), y cambios morfológicos (adoptando una forma redondeada, e incluso puede llegar a transformarse en corpúsculos granulados que emigran por sus movimientos ameboides y con la carga fagocitada).

Una vez activada la microglia su tarea es clave para los procesos inmunológicos del SNC, así como en la remodelación de zonas o la eliminación de detritus, además de que pueden presentar antígenos a linfocitos-T (Kreutzberg, 1995; Becher *et al.*, 2000) y tienen capacidades citotóxicas que se llevan a cabo por varios mecanismos. La activación de las células de microglia en el SNC puede ser estimulada experimentalmente, *in vivo*, en respuesta a lesiones inflamatorias (McNally *et al.*, 2008), isquémicas (Beschoner *et al.*, 2007), mecánicas (Li *et al.*, 2009) y químicas (Carnevale *et al.*, 2007).

Durante el periodo de lesión desmielinizante se produjo reactividad microglial, manifestada por un aumento en el número de estas células, y su modificación de un estadio ramificado a un estadio ameboide en los animales expuestos a LLC. El proceso regenerativo de la zona de lesión desmielinizante es fundamental modular los procesos relacionados con la cicatriz glial que es la causa de fracaso regenerativo. El desarrollo excesivo de tejido conectivo fibroso,

es un impedimento para lograr la regeneración, la fibrosis impide el desplazamiento del cono de crecimiento y sus rebrotes axónicos y, finalmente, las fibras nerviosas se desvían y atrofian, además no es factible su remielinización y su integración (Campbell, 1992).

El objetivo de aplicar la vitamina D (aceptada como neuroesteroide), aparte de evaluar su respuesta en la SVZ en el proceso regenerativo, fue para facilitar la reparación y remielinización de las zonas desmielinizantes (Baulieu y col., 1997, 2000). En el presente estudio, se apoyan los efectos neurotróficos de los neuroesteroides en el cuerpo calloso lesionado por LLC. Un dato interesante fue la capacidad de modular el número de células presentes en la lesión así como el grado de transformación celular.

Hasta el momento, se desconocen los efectos moduladores de neuroesteroides y esteroides gonadales sobre la respuesta microglial en lesiones traumáticas de nervios periféricos (Jones y col., 1999; Ramírez-Expósito, 1999). Está demostrado que la reactividad microglial está involucrada en la reparación ó regeneración del daño neuronal por varios mecanismos: 1) producción de factores tróficos (citocinas y factores de crecimiento) (Jones y col., 1999; Dezawa, 2000); 2) desaferentación, 3) activación de astrocitos (Dezawa, 2000). Sin embargo, hasta el presente se desconocen los efectos que puedan ejercer las hormonas gonadales y neuroesteroides sobre la respuesta microglial en núcleos motores axotomizados; aunque por cultivos microgliales se ha establecido la existencia de receptores para glucocorticoides y mineralocorticoides (Stoll, 1999).

Toda la información referida anteriormente, apoya la existencia de los efectos neurotróficos de los neuroesteroides; siendo capaces de influir en el aspecto morfológico de astrocitos y microglia al actuar sobre receptores y alterando sus funciones metabólicas.

6.3 SUPERVIVENCIA NEURONAL

Se ha demostrado que los neuroesteroides, disminuyen la muerte neuronal al actuar sobre receptores localizados en las motoneuronas de nervios craneales y en los órganos diana (Yu, 1988; 1989; Guennoun, 1997). En estudios previos, la administración de testosterona en hámster macho eleva el ARNr en neuronas, acelera la recuperación funcional de la parálisis facial inducida por aplastamiento del nervio facial a nivel del foramen estilomastoideo, el anti-andrógeno flutamida elimina su recuperación (Kujawa, 1989; Jones, 1993;1997).

En general, los andrógenos y estrógenos aceleran la regeneración de los nervios y los estrógenos son los responsables de las acciones sobre GFAP y velocidad de crecimiento (Jones y col., 1999). Con la administración de la vitamina D, se obtuvieron resultados similares, a los observados en estudios previos con otros neuroesteroides (Yu y col., 1989), mostrando una clara evidencia en la regulación de las células caspasa positivas.

Estudios realizados en conejos demostraron que a partir de la tercera y quinta semana de axotomizar sus fibras faciales, se produjeron alteraciones estructurales en el soma neuronal (edema y ausencia visual de dendritas), siete semanas más tarde, volvieron a su aspecto normal (Wang-Bennet y col., 1990).

Otros estudios describieron cambios morfológicos en núcleo y nucleolo de neuronas inmaduras y maduras posterior a la axotomía. En las primeras, no aparecieron cambios nucleares significativos, presentan su máxima capacidad sintética y aumentan su producción metabólica en respuesta a lesión (Jones y

col., 1986). En cambio, las neuronas maduras presentan diferentes condiciones metabólicas y alteran significativamente su estado metabólico en respuesta a lesión (MacLoon, 1981; Guennoun, 1997).

Efectos similares se presentaron en nuestro estudio, desde los primeros 15 días de lesión, todos los grupos estudiados, presentaron temporalmente cambios morfológicos en núcleo, sustancia Nissl y soma neuronal, logrando una morfología cercana a la normal a la sexta semana tras lesión. Además, la naturaleza de la lesión y las variaciones de las especies utilizadas en los diferentes estudios, pueden influir en la morfología en respuesta a lesión (Guennoun, 1997; Jones y col., 1986, 1999; Dezawa, 2000).

Diferentes efectos poseen los neuroesteroides sobre la morfología astrogial, estudios *in vitro* demostraron que DHA modifica la diferenciación y transformación astrogial (Del cerro y col., 1995; Friess, 2000); PREG modula la extensión de las prolongaciones inmunorreactivas-GFAP (Del cerro y col., 1995; Engel, 2001); mientras que, PROG, PREG, DHA, testosterona (T) y 17 β -estradiol reducen significativamente la inmunoreactividad-GFAP en los sitios de lesión (Garcia-Segura y col., 1996; Garcia-Estrada y col., 1998), este mecanismo puede ser el que la VD utiliza sobre los astrocitos, favoreciendo la supervivencia celular y disminuyendo la tasa de células caspasa 3 positivas.

Con respecto a *oligodendrocitos*, en secciones totales de medula espinal, se demostró a nivel celular y molecular, elevación de marcadores específicos, - CNP (proteína inmadura que expresan los oligodendrocitos inmaduros) y MBP – específica de oligodendrocitos maduros (Morin- Richaud y col., 1998; Dezawa,

1999, 2000), esta evidencia respalda a la encontrada en la zona de lesión, morcando una mayor inmunoreactividad de estos marcadores.

6.4 RECEPTOR DE MEGALINA

En nuestro modelo de estudio, todas las células que expresaron megalina también presentan los marcadores clásicos de la estirpe astrogliar, como GFAP (Mi y Barres et al, 1999). La presencia del marcador megalina en células del linaje oligodendroglial se ha mostrado en médula espinal tanto en rata postnatal como edades adultas (Wicher et al., 2006). La localización nuclear de megalina en oligodendrocitos mielinizantes de la médula espinal sugiere que podría estar implicada en el establecimiento de una vía de señalización directa entre el núcleo y la membrana plasmática, como consecuencia del procesamiento proteolítico del dominio intracelular tras la interacción ligando-receptor (Wicher et al., 2006).

En nuestro caso, la expresión de megalina fue general en todas las estirpes celulares analizadas, independientemente de la administración de un suplemento de vitamina D, lo que podría manifestar que el receptor de megalina se encuentra activo en estadios de regeneración y reparación de zonas desmielinizantes, cabe señalar que en ningún caso no observamos oligodendrocitos maduros positivos para megalina, solo en estadios tempranos Olig2, siendo más marcado en los astrocitos los que expresan el receptor.

Sería fundamental realizar estudios de bloqueadores del receptor de la megalina, con la finalidad de conocer su verdadero efecto sobre la activación de la zona subventricular y la generación de nuevas células de estirpe neuronal y oligodendroglial.

Por todo ello, y para finalizar, se procede a establecer las conclusiones de este trabajo

VII.

CONCLUSIONES

VII CONCLUSIONES

- La vitamina D tiene efectos sobre la proliferación celular en la SVZ y el cuerpo calloso
- La vitamina D favorece la diferenciación celular a células DCX positivas y Olig2 positivas
- La vitamina D modula la respuesta microglial favoreciendo un entorno amigable para la regeneración
- La vitamina D es neuroprotectora al reducir el número de neuronas caspasa positivas en la vecindad de la lesión.

VIII.

BIBLIOGRAFIA

A

- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Hedbacker, H., Oscarsson, J., Eriksson, P.S. (2000). Peripheral infusion of IGF-1 selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.*, 20:2896-2903.
- Aberg, M.A., Aberg, N.D., Palmer, T.D., Alborn, A.M., Carlsson-Skewir, C., Bang, P., Rosenberg, L.E., Olsson, T. Gage, F.H., Eriksson P.S. (2003). IGF-1 has a direct proliferative effect in adult hippocampal progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 24:23-40.
- Abrous, D.N., Koehl, M., Le Moal, M. (2005). Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol. Rev.*, 85: 523–569.
- affecting the developing and adult brain. *Annu Rev Nutr.* 2014;34:117-41.
- Alroy I, Towers TL, Freedman LP. (1995) Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: Direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor. *Mol Cell Biol.*;15:5789—99.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science*, 135: 1127-1128.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. Comp. Neurol.*, 137(4): 433-457.
- Altman, J., Bayer, S.A. (1990). Prolonged sojourn of developing pyramidal cells in the intermediate zone of the hippocampus and their settling in the stratum pyramidale. *The journal of comparative. neurology*, 301:343-364.
- Altman, J., Das, G.D. (1965). Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. Comp. Neurol.*, 124:319-336.
- Álvarez-Buylla, A., Lim, D.A. (2004). For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron*, 41:683–686.
- Álvarez-Buylla, A., Nottebohm, F. (1988). Migration of young neurons in adult avian brain. *Nature*, 335: 353-354.
- Amaral, D.G. (1978). A Golgi study of cell types in the hilar region of the hippocampus in the rat. *J. Comp. Neur.*, 182:851-914.

- Amaral, D.G., Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.
- Ambrogini, P., Orsini, L., Mancini, C., Ferri, P., Ciaroni, S. (2004) Learning may reduce neurogenesis in adult rat dentate gyrus. *Neurosci. Lett.*, 359: 13–16.
- Assemat E, Chatelet F, Chandellier J, Commo F, Cases O, Verroust P, et al. (2005) Overlapping expression patterns of the multiligand endocyte receptors cubilin and megalin in the CNS, sensory organs and developing epithelia of the rodent embryo. *Gene Expr. Patterns*.6:69—78.

B

- Bai, F., Bergeron, M., Nelson, D.L. (2003). Chronic AMPA receptor potentiator (LY451646) treatment increases cell proliferation in adult rat hippocampus. *Neuropharmacology*, 44:1013-1021.
- Balu, D.T., Easton, R.M., Birnbaum, M.J., Lucki, I. (2008). Deletion of Akt isoforms reduce hippocampal neurogenesis, fear conditioning and antidepressant behavioural responses. *Vol.157.11. Society for Neuroscience*,
- Banasr, M., Hery, M., Brezun, J.M., Daszuta, A. (2001). Serotonin mediates oestrogen stimulation of cell proliferation in the adult dentate gyrus. *Eur. J. Neurosci.*, 14(9):1417-1424.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced
- Banati, R.B. (2000). Visualising microglial activation in vivo. *Glia*, 40:206-217.
- Bayer, S.A. (1983). 3H-thymidine-radiographic studies of neurogenesis in the rat olfactory bulb. *Exp. Brain Res.*, 50: 329–340.
- Becher, B., Prat, A., Antel, J.P. (2000). Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia*, 29(4):293-304.
- Bento-Abreu A, Velasco A, Pólo-Hernandez E, Lillo C, Kozyraki R, Tabernero A, et al. (2009) Albumin endocytosis via megalin in astrocytes is caveola- and Dab-1 dependent and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J. Neurochem.*111:49—60.

- Bento-Abreu A, Velasco A, Pólo-Hernandez E, Perez-Reyes PL, Tabernero A, Medina JM. (2008) Megalin is a receptor for albumin in astrocytes and is required for the synthesis of the neurotrophic factor oleic acid. *J Neurochem.* 106:1149-59.
- Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 17:491-500.
- Beschorner, R., Sitmon, P., Schauer, N., Mittelbronn, M., Schaluesener, H.J., Trautmann, K., Dietz, K., Meyermann, R. (2007). Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology*, 50, 897–910.
- Biagini G, Rustichelli C, Curia G, Vinet J, Lucchi C, Pugnaghi M, Meletti S. (2013) Neurosteroids and epileptogenesis. *J Neuroendocrinol.* Nov;25(11):980-90. doi: 10.1111/jne.12063. Review.
- Biebl, M., Cooper, C.M., Winker, J., Kuhn, H.G. (2000). Analysis of neurogenesis and programmed cell death reveals a self-renewing capacity in the adult rat brain. *Neurosci.*, 21:6718-6731.
- Bielecki B, Mattern C, Ghomari AM, Javaid S, Smietanka K, Abi Ghanem C, Mhaouty-Kodja S, Ghandour MS, Baulieu EE, Franklin RJ, Schumacher M, Traiffort E. (2016) Unexpected central role of the androgen receptor in the spontaneous regeneration of myelin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 20;113(51):14829-14834. doi: 10.1073/pnas.1614826113. Epub 2016 Dec 7.
- Bikle DD, Gee E, Halloran B, Haddad JG. (1984) Free 1,25-dihydroxyvitamin D levels in serum from normal subjects, pregnant subjects, and subjects with liver disease. *J Clin Invest.* 74:1966—71.
- Bikle DD, Siiteri PK, Ryzen E. (1985) Serum protein binding of 1,25-dihydroxyvitamin D: a reevaluation by direct measurement of free metabolite levels. *J Clin Endoc Met.* 61:969—75.
- Bizon, J.L., Gallagher, M. (2003). Production of new cells in the rat
- Bouillon R, van Assche FA, van Baelen H, Heyns W, de Moor P. (1981) Influence of the vitamin D-binding protein on the serum concentration of

- 1,25-dihydroxy vitamin D3. Significance of the free 1,25-dihydroxyvitamin D3 concentration. *J Clin Invest.*67:589—96.
- Bouillon R, van Baelen H, de Moor P. (1980) Comparative study of the affinity of the serum vitamin D-binding protein. *J Ster Biochem.*13:1029—34.
 - Brinton RD. (2013) Neurosteroids as regenerative agents in the brain: therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol.* Apr;9(4):241-50. doi: 10.1038/nrendo.2013.31.
 - Brown J, Bianco JI, McGrath JJ, Eyles DW. (2003). 1,25- Dihydroxyvitamin D3 induces nerve growth factor, promotes neurite outgrowth and inhibits mitosis in embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett.* 343: 139—43.
 - Bruel-Jungerman, E., Laroche, S., Rampon, C. (2005). New neurons in the dentate gyrus are involved in the expression of enhanced long-term memory following environmental enrichment. *Eur. J. Neurosci.*, 21:513—521.
 - Bursztajn, S., Falls, W.A., Berman, S.A., Friedman, M.J. (2007). Cell proliferation in the brains of NMDAR NR1 transgenic mice. *Brain. Res.* 1172:10-20.
- C
- Cacci, E., Ajmone-Cat, M.A., Anelli, T., Biagioni, S., Minghetti, L. (2008). In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia*, 56(4):412-25.
 - Calza, L., Giardino, L., Pozza, M., Betteli, C., Micera, A., Aloe, L. (1998). Proliferation and phenotype regulation in the subventricular zone during experimental allergic encephalomyelitis: in vivo evidence of a role for nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95:3209-3214.
 - Cameron, H.A., Hazel, T.G., McKay, R.D. (1998). Regulation of neurogenesis by growth factors and neurotransmitters. *J. Neurobiol.*, 36:287—306.

- Cameron, H.A., McKay, R.D. (2001). Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 435:406–417.
- Cameron, H.A., Woolley, C.S., Gould, E. (1993). Adrenal steroid receptor immunoreactivity in cells born in the adult rat dentate gyrus. *Brain Res.*, 611:342–346.
- Cannell JJ. (2017). Vitamin D and autism, what's new? *Rev Endocr Metab Disord.* Feb 20. doi: 10.1007/s11154-017-9409-0
- Caviness, V.S. Jr., Takahashi, T., Nowaskowski, R.S. (2000). Neuronogenesis and the early events of neocortical histogenesis. *Results Probl Cell Differ.*, 30:107-143.
- Chaudhuri A. (2005). Why we should offer routine vitamin D supplementation in pregnancy and childhood to prevent multiple sclerosis. *Med Hypotheses* 64:608–615.
- Christ A, Christa A, Kur E, Lioubinski O, Bachmann S, Willnow TE, et al. (2012). LRP2 an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev Cell.* 22:268—78.
- Christensen EI, Birn H. (2001). Megalin and cubilin: Synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280:F562—73.
- Chun JT, Wang L, Pasinetti GM, Finch CE, Zlokovic BV. (1999). Glycoprotein 330/megalin (LRP-2) has low prevalence as mRNA and protein in brain microvessels and choroid plexus. *Exp Neurol.* 157:194—201.
- Chun RF, Peercy BE, Orwoll ES, Nielson CM, Adams JS, Hewison M. (2014). Vitamin D and DBP: The free hormone hypothesis revisited. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 144(Pt A):132—7.
- Colciago A, Magnaghi V. (2016) Neurosteroids Involvement in the Epigenetic Control of Memory Formation and Storage. *Neural Plast.* 2016:5985021. doi: 10.1155/2016/5985021
- Cooke NE, Haddad JG. (1989). Vitamin D binding protein (Gc-globulin). *Endocrin Rev.* 10:294—307.

- DeLuca HF. (2004). Overview of general physiologic features and functions of vitamin D1–4. *Am J Clin Nutr* 80 (6 Suppl):1689–1896.
- Döbrössy, M.D.E., Aurousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P.V., Abrous, D.N. (2003). Differential effects of learning on neurogenesis: Learning increases or decreases the number of newly born cells depending on their birth date. *Mol. Psychiatry*, 8: 974–982.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J.M., Álvarez-Buylla, A. (1997). Cellular Composition and Three-Dimensional Organization of the Subventricular Germinal Zone in the Adult Mammalian Brain. *J. Neurosci.*, 17(13):5046–5061.
- Doetsch, F., Petreanu, L., Caille, I., García-Verdugo, J.M. (2002). EGF Converts Transit-Amplifying Neurogenic Precursors in the Adult Brain into Multipotent Stem Cells. *Neuron*, 36:1021–1034.
- Dumont D, Noben JP, Raus J, Stinissen P, Robben J. (2004). Proteomic analysis of cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Proteomics*. 4:2117-24.
- Dusso AS, Kamimura S, Gallieni M, Zhong M, Negrea L, Shapiro S, et al. (1997). Interferon-induced resistance to 1,25-(OH)₂ D₃ in human monocytes and macrophages: A mechanism for the hypercalcemia of various granulomatoses. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:2222-32.

E

- Eisch, A.J. (2002). Adult neurogenesis: implications for psychiatry. *Prog. Brain. Res.*, 138:315–342.
- Eisch, A.J., Harburg, G.C. (2006). Opiates, Psychostimulants, and Adult Hippocampal Neurogenesis: Insights for Addiction and Stem Cell Biology. *Hippocampus*, 16:271–286.
- El Waly B, Macchi M, Cayre M, Durbec P. (2014). Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci*. Jun 12;8:145. doi: 10.3389/fnins.2014.00145. eCollection 2014.
- Encinas, J.M., Enikolopov, G. (2008). Identifying and quantitating neural stem and progenitor cells in the adult brain. *Methods. Cell. Biol.*, 85:243-272.

- Encinas, J.M., Vaahtokari, A., Enikolopov, G. (2006). Fluoxetine targets early progenitor cells in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*,103:8233-8238.
- Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjoumlrk-Ericsson, T., Alborn, A.M., Nordb, C. (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Med.*, 4:1313-1317
- Ernst A, Alkass K, Bernard S, Salehpour M, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisén J. (2014) Neurogenesis in the striatum of the adult human brain. *Cell*. Feb 27;156(5):1072-83. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.044.
- Estrada, F.S., Hernández, V.S., Medina, M.P., Corona-Morales, A.A., Gonzalez-Perez, O., Vega-Gonzalez, A., Zhang, L. (2009). Astrogliosis is temporally correlated with enhanced neurogenesis in adult rat hippocampus following a glucoprivic insult. *Neuroscience Letters*, 459:109–114.
- Eyles DW, Smith S, Kinobe R, Hewison M, McGrath JJ. (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat*. 29:21-30.

F

- Fitzgerald M, Nairn P, Bartlett CA, Chung RS, West AK, Beazley LD. (2007). Metallothionein-IIA promotes neurite growth via the megalin receptor. *Exp Brain Res*. 183:171—80.
- Freund, T.F., Buzsaki, G. (1996). Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus*, 6:347-470.
- Friocurt, G., Koulakoff, A., Chafey, P., Boucher, D., Fauchereau, F., Chelly, J., Francis, F. (2003). Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb. Cortex*, 13:620-626.
- Fulmer CG, vonDran MW, Stillman AA, Huang Y, Hempstead BL, Dreyfus CF. (2014). Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J Neurosci*. 34:8186—96.
- Furman I, Baudet C, Brachet P. (1996). Differential expression of MCSF, LIF, and TNF-alpha genes in normal and malignant rat glial cells: Regulation by lipopolysaccharide and vitamin D. *J Neurosci Res*.46:360-6.

G

- Garcia, A., Steiner, B., Kronenberg, G., Bick-Sander, A., Kempermann, G. (2004). Age-dependent expression of glucocorticoid- and mineralocorticoid receptors on neural precursor cell populations in the adult murine hippocampus. *Aging Cell*, 3:363–371.
- Garcion E, Sindji L, Nataf S, Brachet P, Darcy F, Montero-Menei CN, et al. (2003). Treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis in rat by 1,25 dihydroxyvitamin D3 leads to early effects within the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 105:438-48.
- Ge, S., Goh, E.L., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G.L., Song, H. (2006). GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439:589-593.
- Gehrmann, J. (1996). Microglia: a sensor to threats in the nervous system?.
- Gehrmann, J., Matsumoto, Y., Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia: intrinsic immuneffector cell of the brain. *Brain Res. Rev.*, 20:269-287.
- Gloth FM, Alam W, Hollis B. (1999) Vitamin D vs broad spectrum phototherapy in the J Nutr Health Aging. 3(1):5-7.
- González-Pérez, O., González-Castañeda, R.E., Huerta, M., Luquin, S., Gómez-Pinedo, U., Sánchez-Almaraz, E., Navarro-Ruiz, A., García-Estrada, J. (2002). Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci. Lett.*, 321(1-2):100-104.
- Groves NJ, Mc Grath JJ, Burne TH. (2014). Vitamin D as a neurosteroid *Annu Rev Nutr.* 34:117-41. doi: 10.1146/annurev-nutr-071813-105557.

H

- Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. (2013). Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int.* 92:77—98.
- Holmoy T, Moen SM, Gundersen TA, Holick MF, Fainardi E, Castellazzi M, et al. (2009). 25-hydroxyvitamin D in cerebrospinal fluid during relapse and remission of multiple sclerosis. *Mult Scler.* 15:1280-5.

J

- Jacobs, B.L., Praag, H., Gage, F.H. (2000). Adult brain neurogenesis and psychiatry: a novel theory of depression. *Mol. Psychiatry*, 5:262–269.
- Johansson, C.B. Svensson, M., Wallstedt, L., Janson, A.M., Frisen, J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Exp. Cell. Res.*, 253:733-736.

K

- Kahn, L., Alonso, G., Normand, E., Manzoni, O.J. (2005). Repeated morphine treatment alters polysialylated neural cell adhesion molecule, glutamate decarboxylase-67 expression and cell proliferation in the adult rat
- Kalueff AV, Eremin KO, Tuohimaa P. (2004). Mechanisms of neuroprotective action of vitamin D3. *Biochemistry (Mosc)* 69:738–741.
- Kalueff AV, Minasyan A, Keisala T, et al. (2006). The vitamin D neuroendocrine system as a target for novel neurotropic drugs. *CNS Neurol Disords Drug Targets* 5:363–371.
- Kaplan, M.S., Bell, D.H. (1984). Mitotic neuroblasts in the 9-day-old and 11- month-old rodent hippocampus. *J. Neurosci.*, 4:1429-1441.
- Kato, H., Takahashi, A., Itoyama, Y. (2003). Cell cycle protein expression in proliferating microglia and astrocytes following transient global cerebral ischemia in the rat. *Brain. Res. Bull.*, 60:215-221.
- Kee, N., Sivalingam, S., Boonstra, R., Wojtowicz, J.M. (2002). The utility of Ki-67 and BrdU as proliferative markers of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Meth.*, 115:97–105.
- Kempermann G, Song H, Gage FH. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Sep 1;7(9):a018812. doi: 10.1101/cshperspect.a018812
- Kempermann G. (2011). Seven principles in the regulation of adult neurogenesis. *Eur J Neurosci.* Mar;33(6):1018-24. doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07599.x.
- Kempermann, G., Wiskott, L., Gage, F.H. (2004). Functional significance of adult neurogenesis. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 14:186–191.

- Kempermann, G., Kronenberg, G. (2003). Depressed new neurons adult hippocampal neurogenesis and a cellular plasticity hypothesis of major depression. *Biol. Psychiatry.*, 54:499–503.
- Kempermann, G., Kuhn, H.G., Gage, F.H. (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495.
- Koch M, Metz LM, Kovalchuk O. (2013). Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol.* 9:35-43.
- Kochman, L.J., Dos Santos, A.A., Fornal, C.A., Jacobs, B.L. (2006). Despite strong behavioral disruption, Delta (9)-tetrahydrocannabinol does not affect cell proliferation in the adult mouse dentate gyrus. *Brain Res.*, 1113(1):86-93.
- Kolb, B., Gorny, G., Li, Y., Samaha, A.N., Robinson, T.E. (2003). Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:10523–10528.
- Kozorovitskiy, Y., Gould, E. (2003). Adult neurogenesis: a mechanism for brain repair?. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, 25(5):721-732.
- Kreutzberg, G.W. (1995). Microglia, the first line of defence in brain pathologies. *Arzneimittelforschung.*, 45(3A):357-360.
- Kronenberg, G., Reuter, K., Streiner, B., Brandt, M.D., Jessberger, S., Yamaguchi, M., Kempermann, G. (2003). Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.*, 467:455-463.
- Küçükali C'I, Kürtüncü M, C,oban A, C,ebi M, Tüzün E. (2015). Epigenetics of multiple sclerosis: An updated review. *Neuromolecular Med.*17:83-96.
- Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Fuchs, E. (2001). Adult neurogenesis: a compensatory mechanism for neuronal damage. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, 251(4):152-158.
- Kuhn, H.G., Winkler, J., Kempermann, G., Thal, L.J., Gage, F.H. (1997). Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different

effects on neural progenitors in the adult rat brain. *J. Neurosci.*, 17(15):5820–5829.

L

- LaFerla FM, Troncoso JC, Strickland DK, Kawas CH, Jay G. (1997)- Neuronal cell death in Alzheimer's disease correlates with apo uptake and intracellular Abeta stabilization. *J Clin Invest.*100:310—20.
- Landowski LM, Pavez M, Brown LS, Gasperini R, Taylor BV, West AK, Foa L. (2016). Low-density Lipoprotein Receptor-related Proteins in a Novel Mechanism of Axon Guidance and Peripheral Nerve Regeneration. *J Biol Chem.* Jan 15;291(3):1092-102. doi: 10.1074/jbc.M115.668996. Epub 2015 Nov 23.
- Lang, B., Liu, H.L., Liu, R., Feng, G.D., Jiao, X.Y., Ju, G. (2004). Astrocytes in injured adult rat spinal cord may acquire the potential of neural stem cells. *Neuroscience*, 128(4):775-783.
- Lefebvre d'Hellencourt C, Montero-Menei CN, Couez Z. (2003). Vitamin D3 inhibits proinflammatory cytokines and nitric oxide production by the EOC13 microglial cell line. *J Neurosci Res.* 71:575-82.
- Lepousez G, Nissant A, Lledo PM. (2015). Adult neurogenesis and the future of the rejuvenating brain circuits. *Neuron.* Apr 22;86(2):387-401. doi: 10.1016/j.neuron.2015.01.002.
- Lim, D.A., Huang, Y.C., Alvarez-Buylla, A. (2007). The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg. Clin. N. Am.*, 18(1):81-92.
- Lin, H.M., Liu, C.Y., Jow, G.M., Tang, C.Y.(2009). Toluene disrupts synaptogenesis in cultured hippocampal neurons. *Toxicol. Lett.*, 184(2):90- 96.
- Lois, C., Alvarez-Buylla, A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science*, 264(5162): 1145-1148.
- Lucassen PJ, Oomen CA, Naninck EF, Fitzsimons CP, van Dam AM, Czeh B, Korosi A. (2015). Regulation of Adult Neurogenesis and Plasticity by (Early) Stress, Glucocorticoids, and Inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Sep 1;7(9):a021303. doi: 10.1101/cshperspect.a021303.

- Luoma JI, Stern CM, Mermelstein PG. (2012). Progesterone inhibition of neuronal calcium signaling underlies aspects of progesterone-mediated neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol*. Aug;131(1-2):30-6. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.11.002.

M

- Matías-Guío J, Oreja-Guevara C, Matias-Guiu JA, Gomez-Pinedo U. (2016). Vitamin D and remyelination in multiple sclerosis. *Neurologia*. Jun 16. pii: S0213-4853(16)30065-2. doi: 10.1016/j.nrl.2016.05.001.
- Miyamoto N, Maki T, Shindo A, Liang AC, Maeda M, Egawa N, Itoh K, Lo EK, Lok J, Ihara M, Arai K. (2015). Astrocytes Promote Oligodendrogenesis after White Matter Damage via Brain-Derived Neurotrophic Factor. *J Neurosci*. Oct 14;35(41):14002-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1592-15.2015.
- Morris SM, Tallquist MD, Rock CO, Cooper JA. (2002). Dual roles for the Dab2 adaptor protein in embryonic development and kidney transport. *EMBO J*. 21:1555—64.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly, et al. (2004). Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurol* 62:60—65.

N

- Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. (2005). Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev*. 26:662—87.
- Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Ohyama KY, Brachet P, Wion D. (1993). Expression of 25(OH) vitamin D3 24-hydroxylase gene in glial cells. *Neuroreport*. 5:255-7.
- Naveilhan P, Neveu I, Wion D, Brachet P. (1996). 1,25-Dihydroxyvitamin D3, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Neuroreport*. 7:2171—5.
- Nykjaer A, Fyfe JC, Kozyraki R, Leheste JR, Jacobsen C, Nielsen MS, et al. (2001). Cubilin dysfunction causes abnormal metabolism of the steroid hormone 25(OH) vitamin D(3). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:13895—21390.

O

- Ortega MC, Cases O, Merchán P, Kozyraki R, Clemente D, de Castro F. (2012) Megalin mediates the influence of sonic hedgehog on oligodendrocyte precursor cell migration and proliferation during development. *Glia*. May;60(6):851-66. doi: 10.1002/glia.22316.
- Ozer S, Ulusahin A, Ulusoy S, et al. (2004). Is vitamin D hypothesis for schizophrenia valid? Independent segregation of psychosis in a family with vitamin D dependent rickets type IIA. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 28:255–266.

P

- Pencea, V., Bingaman, K.D., Freedman, L.J., Luskin, M.B. (2001). Neurogenesis in the Subventricular Zone and Rostral Migratory Stream of the Neonatal and Adult Primate Forebrain. *Experimental Neurology*, 172:1– 16.
- Pereira F, Barbachano A, Singh PK, Campbell MJ, Muñoz A, Larriba MJ. (2012). Vitamin D has wide regulatory effects on histone demethylase genes. *Cell Cycle*. 11:1081-9.
- Pike JW, Meyer MB, Bishop KA. (2012). Regulation of target gene expression by the vitamin D receptor, an update on mechanisms. *Rev Endocr Metab Disord*. 13:45—55.
- Powe CE, Evans MK, Wenger J, Zonderman AB, Berg AH, Nalls M, et al. (2013). Vitamin D-binding protein and vitamin D status of black Americans and white Americans. *N Engl J Med*. 369:1991—2000.
- Prüfer K, Veenstra TD, Jirikowski GF, Kumar R. (1999). Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *J Chem Neuroanat*. 16: 135-45.

Q

- Quinones-Hinojosa, A., Sanai, N., Soriano-Navarro, M., Gonzalez-Perez, O., Mirzadeh, Z., Gil-Perotin, S., Romero-Rodriguez, R., Berger, M.S., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A. (2006). Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J. Comp. Neurol.*, 494(3): 415-434.

R

- Ramón-Cajal, S. (1904). *Textura del Sistema Nervioso Central del Hombre y los Vertebrado*. Ed. Moya, Madrid.

- Reynolds, B.A., Tetzlaff, W., Weiss, S. (1992). A multipotent EGFresponsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.*, 12(11): 4565-4574.

S

- Seri, B., García-Verdugo, J.M., Collado-Morente, L., McEwen, B.S., Álvarez-Buylla, A. (2004). Cell Types, Lineage, and Architecture of the Germinal Zone in the Adult Dentate Gyrus. *J. Comp. Neurol.*, 478:359–378
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A. (2001). Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J. Neurosci.*, 21(18):7153–7160.
- Smolders J, Moen SM, Damoiseaux J, Huitinga I, Holmoy T. (2011). Vitamin D in the healthy and inflamed central nervous system: Access and function. *J Neurol Sci.* 311:37-43.
- Smolders J, Schuurman KG, van Strien ME, Melief J, Hendrickx D, Hol EM, et al. (2013). Expression of vitamin D receptor and metabolizing enzymes in multiple sclerosis-affected brain tissue. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72:91-105.
- Song, H., Stevens, C.F., Gage, F.H. (2002). Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons. *Nature*, 5(5): 39-44.
- Spach KM, Hayes CE. (2005). Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. *J Immunol.* 175:4119-26.
- Stio M, Lunghi B, Iantomasi T, et al. (1993). Effects of vitamin D deficiency and 1,25- dihydroxyvitamin D3 on metabolism and D-glucose transport in rat cerebral cortex. *J Neurochem Res* 35:559–566.
- Stumpf WE, Privette TH. (1989). Light, vitamin D and psychiatry. Role of 1,25 dihydroxyvitamin D3 (solatriol) in etiology and therapy of seasonal affective disorder and other mental processes. *Psychopharmacology* 97:285–294.

- Stumpf WE, Privette TH. (1991). The steroid hormone of sunlight soltritol (vitamin D) as a seasonal regulator of biological activities and photoperiodic rhythms. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Aug;39(2):283-9.
- Stumpf WE, Sar M, Clark SA, DeLuca HF. (1982). Brain target sites for 1,25- dihydroxyvitamin D3. *Science* 215:1403–1405.

T

- Takeuchi A, Reddy GS, Kobayashi T, Okano T, Park J, Sharma S. (1998). Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3-mediated effects. *J Immunol.* 160:209—18.

V

- Veenstra TD, Prüfer K, Koenigsberger C, Brimijoin SW, Grande JP, Kumar R. (1998). 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the central nervous system of the rat embryo. *Brain Res.* 804:193-205.
- Vieth R, Kimball S, Hu A, Walfish PG. (2004). Randomized comparison of the effects of the vitamin D3 adequate intake versus 100 mcg (4000 IU) per day on biochemical responses and the wellbeing of patients. *Am J Clin Nutr* 80:1752S–1758S.
- Vieth R. (1994). Simple method for determining specific binding capacity of vitamin D binding protein and its use to calculate the concentration of “free” 1,25 dihydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 40:435—41.

W

- Walbert T, Jirikowski GF, Prufer K. (2001). Distribution of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor immunoreactivity in the limbic system of the rat. *Horm Metab Res* 33:525–531.
- Winner B, Winkler J. (2015). Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* Apr 1;7(4):a021287. doi: 10.1101/cshperspect.a021287.
- Wolff NA, Lee WK, Abouhamed M, Thevenod F. (2008). Role of ARF6 in internalization of metal-binding proteins, metallothionein and transferrin, and cadmium metallothionein toxicity in kidney proximal tubule cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 230:78—85.

Y

- Yuseff MI, Farfan P, Bu G, Marzolo MP. (2007). A cytoplasmic PPPSP motif determines megalin's phosphorylation and regulates receptor's recycling and surface expression. *Traffic*. 8:1215—30.

Z

- Zarbalis K, May SR, Shen Y, Ekker M, Rubenstein JLR, Peterson AS. (2004). A focused and efficient genetic screening strategy in the mouse: Identification of mutations that disrupt cortical development. *PLoS Biol*. 2:1179—87.
- Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, et al. (2014). An RNA sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci*. 34:11929-47.
- Zhang, L., Corona-Morales, A.A., Vega-González, A., García-Estreda, J., Escobar, A. (2009). Dietary tryptophan restriction in rats triggers astrocyte cytoskeletal hypertrophy in hippocampus and amygdale. *Neuroscience Letters*, 450:242–245.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G. Jr, Ming, G.L. y Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J. Neurosci.*, 26:3–11.
- Zhao, M., Li, D., Shimazu, K., Zhou, Y.X., Lu, B., Deng, C.X. (2007). Fibroblast growth factor receptor-1 is required for long-term potentiation, memory consolidation, and neurogenesis. *Biol. Psychiatry.*, 62:381-390.
- Zheng G, Bachinsky DR, Stamenkovic I, Strickland DK, Brown D, Andres G, et al. (1994). Organ distribution in rats of two members of the low-density lipoprotein receptor gene family, gp330 and LRP/alpha 2 MR, and the receptor-associated protein (RAP). *J Histochem Cytochem*. 42:531-42.
- Zupanc, G.K.H., Horschke, I. (1995). Proliferations zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.*, Mar 6;353(2):213-33.

- Zwain, I.H., Yen, S.S. (1999). Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*, 140:3843-3852.